

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
WIRKSAMKEIT VERSCHIEDENER PFERDEINFLUENZA-VACCINEN
IM KANINCHEN, MEERSCHWEINCHEN UND IN DER MAUS**

Christine Moll

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Mayr

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
WIRKSAMKEIT VERSCHIEDENER PFERDEINFLUENZA-VACCINEN
IM KANINCHEN, MEERSCHWEINCHEN UND IN DER MAUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Christine Moll

aus

Aschau

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München



Dekan: Professor Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Professor Dr. A. Mayr

Korreferent: Professor Dr. H. Kraft

Tag der Promotion: 5. Februar 1971

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2,1 Wesen und Bedeutung der Pferdeinfluenza	2
2,1.1 Definition	2
2,1.2 Bedeutung der Pferdeinfluenza	3
2,1.3 Größe und Struktur des Pferdeinfluenza- virus	4
2,1.4 Variationen des Pferdeinfluenzavirus	6
2,1.5 Beziehung des Pferdeinfluenzavirus zu anderen Influenzaviren	7
2,2 Immunisierungsvorgänge bei der Pferdeinfluenza	9
2,2.1 Aktiv erworbene Immunität im Verlaufe einer natürlichen Infektion	9
2,2.2 Aktiv erworbene Immunität nach Schutzimpfung	11
2,2.3 Natürlich erworbene, passive Immunität	14
2,2.4 Künstlich erworbene, passive Immunität	15
2,3 Impfstoffe gegen die Pferdeinfluenza	15
2,3.1 Allgemeines	15
2,3.2 Lebendimpfstoffe	16
2,3.3 Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	16
2,4 Postvaccinale Kompli- kationen	19
2,5 Methoden zur Prüfung von Influenzavaccinen	21
2,5.1 Allgemeines	21
2,5.2 Prüfung auf Unschädlichkeit	22
2,5.2.1 Verträglichkeitsprüfung beim Pferd	23

2,5.2.2	Nachweis pyrogener und toxischer Stoffe im Versuchstier	23
2,5.2.3	Nachweis auf Freisein von Bakterien und Pilzen	23
2,5.2.4	Nachweis auf Freisein von vermehrungsfähigem Influenzavirus und auf Fremdviren	24
2,5.3	Prüfung auf Wirksamkeit	24
2,5.3.1	Allgemeines	24
2,5.3.2	Wirksamkeitsprüfung am Versuchstier	25
2,5.3.2.1	Kreuzschutztest	26
2,5.3.2.2	Antikörpernachweis	26
 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN		
3,1	M a t e r i a l u n d M e t h o d e n	29
3,1.1	Impfstoffe	29
3,1.2	Versuchstiere	30
3,1.3	Impftechnik	30
3,1.4	Blutentnahme und Narkose	31
3,1.5	Impfschema	31
3,1.6	Antigen und Antigenherstellung	32
3,1.7	Hämagglutinationstest	32
3,1.8	Hämagglutinationshemmungstest	32
3,2	V e r s u c h e u n d E r g e b n i s s e	33
3,2.1	Antikörperbildung in Kaninchen, Meerschweinchen und Maus nach Verimpfung der einzelnen Impfstoffe	33
3,2.1.1	Allgemeine Beobachtungen	33
3,2.1.2	Einzelergebnisse	35
3,2.1.2.1	Beim Kaninchen	35
3,2.1.2.2	Beim Meerschweinchen	36
3,2.1.2.3	Bei der Maus	38
3,2.2	Verträglichkeit der getesteten Impfstoffe in den einzelnen Tiersystemen	39
 4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE		
4,1	K r i t i s c h e B e t r a c h t u n g der Messmethode	42
4,2	V e r g l e i c h e n d e A u s w e r t u n g der Wirksamkeit der getesteten Impfstoffe	43

4,3 Vergleichende Auswertung der drei Wirtssysteme bezüglich ihrer Eignung zur Wirksamkeitsprüfung der Pferdeinfluenza-Impfstoffe

46

5. ZUSAMMENFASSUNG

50

6. TABELLEN

54

7. ABBILDUNGEN

59

8. LITERATURVERZEICHNIS

66

9. LEBENS LAUF

70

1. EINLEITUNG

Zur Bekämpfung der Pferdeinfluenza hat sich als Methode der Wahl in den letzten Jahren die aktive Schutzimpfung durchgesetzt. Die Folge war, daß sich zahlreiche Firmen mit der Herstellung entsprechender Impfstoffe befaßten. Die Tierärzteschaft und Pferdezucht ist sehr daran interessiert, daß nur wirksame und unschädliche Impfstoffe zum Einsatz kommen. Eine Kontrolle der Impfstoffe ist deshalb unentbehrlich.

Bei der Impfstoffprüfung unterscheidet man zwei große Gruppen, die Prüfung auf Unschädlichkeit und die Prüfung auf Wirksamkeit. Die Wirksamkeitsprüfung erfolgt letztlich am Pferd. Als Vorstufe hat es sich jedoch bewährt, Prüfungen im kleinen Versuchstier einzubauen, einmal um die teuren Pferdeversuche auf ein Minimum zu beschränken, und zum anderen, durch Erhöhung der Versuchstierzahlen, eine bessere biometrische Auswertung und Signifikanz der Ergebnisse zu erreichen.

Als Versuchstiere kommen hauptsächlich in Betracht:
Kaninchen, Meerschweinchen und Mäuse.

Vergleichende Untersuchungen über die Eignung dieser drei Tierarten für eine Wirksamkeitsprüfung von Pferdeinfluenzavaccinen liegen bisher nicht vor.

Aufgabe vorliegender Arbeit ist es deshalb, obige drei Wirtssysteme vergleichend auf ihre Eignung für eine Wirksamkeitsprüfung von Pferdeinfluenzavaccinen zu überprüfen. Gleichzeitig sollen dabei die derzeit auf dem Markt befindlichen Impfstoffe, bezüglich ihrer Wirksamkeit in den drei Testsystemen, untersucht werden.

2. SCHRIFTTUM

2,1 Wesen und Bedeutung der Pferde- influenza

2,1.1 Definition

Die Pferdeinfluenza ist eine hochkontagiöse, fieberhafte, virusbedingte Erkrankung des Respirationsapparates, die unter den klinischen Leitsymptomen einer katarrhalischen Entzündung der Atmungsorgane und einem trockenen, kräftigen Husten abläuft.

Waldmann und Köbe (44) wiesen 1934 durch Übertragung bakterienfreier Lungenfiltrate hustenkranker Pferde auf gesunde Tiere nach, daß der Erreger ein Virus ist. Inzwischen ist der Erreger morphologisch, biologisch und chemisch genau charakterisiert. Er gehört zur Myxovirus-Gruppe und tritt in zwei sereologisch unterschiedlichen Typen auf, die als Influenzavirus A-equi 1 und Influenzavirus A-equi 2 bezeichnet werden.

Da die Pferdeinfluenza häufig zu sehr unterschiedlichen klinischen Symptomen führt, nahm man früher an, daß es sich auch um ätiologisch unterschiedliche Erkrankungen handelt. Sie wurden teils nach ihren klinischen Erscheinungsformen, teilweise auch nach Ortschaften, in denen sie zum erstenmal beobachtet wurden, benannt.

Auf diese Weise entstand eine Vielzahl von Namen für die Pferdeinfluenza. Die wichtigsten sind:

Hoppegartener Husten (1933)

Ansteckender Husten

Seuchenhafter Husten

Pferdegrippe (28)

Newmarket Cough

Epizootischer Kehlkopfluftröhrenkatarrh

Infektiöse Pferde-Bronchitis

Infektiöse Tracheobronchitis

Skalma

Sarasanii Katarrh.

Man weiß heute, daß alle diese Krankheiten nichts anderes als eine Pferdeinfluenza sind und durch den gleichen Erreger hervorgerufen werden (22).

2,1.2 Bedeutung der Pferdeinfluenza

Die Pferdeinfluenza belastete die Pferdezucht und Haltung von jeher. Durch die Umstrukturierung der Haltung landwirtschaftlicher Tiere haben sich jedoch die epidemiologischen und epizootologischen Gegebenheiten stark verändert.

In bäuerlichen Betrieben alter Art, in denen eine geringe Zahl von Pferden als Arbeitstiere oder teilweise als Reittiere gehalten wurden, spielte die Pferdeinfluenza keine Rolle. Die Tiere lebten in einem relativ einheitlichen Milieu und setzten sich mit der heimischen Mikrowelt auseinander. Immune Stuten übertrugen die Immunität auf die Jungen. Der Kontakt mit anderen Pferden war gering, entsprechend gering war auch die Erkrankungskhäufigkeit. Für das Militär, das zu dieser Zeit sehr stark auf Pferde als Zug- und Reittiere angewiesen war, bedeutete die Pferdeinfluenza jedoch eine ernst zu nehmende Gefahr. Nach Kauf der Jungtiere aus unterschiedlichen Biotopen, entstanden in den Einheiten immer wieder Enzootien. In gleicher Weise waren die zum Training neu zusammenkommenden Rennpferde belastet.

Heute hat die Pferdeinfluenza hauptsächlich in der Vollblutzucht beim Rennen (Traber, Galopper), dem Turniersport und in den Reitvereinen Bedeutung. Die Enzootien brechen immer dann aus, wenn Tiere aus unterschiedlichen Gestüten und Stallungen zu obigen Zwecken zusammenkommen. Ein einziges Influenzavirus tragendes Pferd genügt, um eine Hustenerkrankung bei ungeschützten Pferden hervorzurufen. In der Vollblutzucht tritt die Erkrankung hauptsächlich in der Zeit von April bis Ende Oktober, also während der Rennsaison, auf. Besonders gefährdet sind junge Tiere, die erstmals am Rennen teilnehmen. Treten

die ersten Anzeichen einer Erkrankung auf, so ist eine unbedingte Ruhigstellung des Tieres erforderlich. Wird sie nicht eingehalten, können bakterielle Sekundärinfektionen Spätschäden bewirken.

Die finanziellen Schäden ergeben sich hauptsächlich durch die Ruhigstellung der Tiere während der Erkrankung, die Behandlungskosten und, bei Nichtbeachtung der Ruhigstellung, durch die schweren Spätschäden, die vom Leistungsabfall bis zur Dämpfigkeit führen können. Schließlich müssen noch die Kosten für die Impfstoffe berücksichtigt werden. Bei trächtigen Stuten kommt es gelegentlich zum Abort.

2,1.3 Größe und Struktur des Pferdeinfluenzavirus

Das Pferdeinfluenzavirus ist ein Influenza-A Virus und gehört in die Subgruppe "Influenza" der Myxovirus-Gruppe. Es besitzt alle Eigenschaften dieser Vertreter. Die wichtigsten sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß das Pferdinfluenzavirus hochstrukturiert ist und als Hauptcharakteristikum neben dem helikalen Nukleokapsid eine Hülle besitzt, in der unterschiedliche Aktivitäten lokalisiert sind. Grob gesehen besteht die Hülle aus Lipoprotein-Membranmaterial in das das Hämagglutinin, die Neuraminidase und eine wirtsspezifische Komponente in regelmäßiger Anordnung eingelagert sind. Der Raum zwischen dem Nukleokapsid als Innenkörper und der Hülle wird durch ein Hämagglutinin-Gel ausgefüllt. Morphologisch stellen sich Hämagglutinin und Neuraminidase als Spikes dar. Sie sind ca. 8 nm lang und bilden die äußerste Schicht der Hülle. Darauf folgt eine elektronentransparente Schicht von gleichmäßiger Dicke. Der innere Teil der Hülle besteht aus feinem Granulat, das kreisförmig angeordnet ist. Der Durchmesser dieser Schicht beträgt 4 nm.

Die Neuraminidase und die Hämagglutinine sind Träger des V-Antigens. Während das Hämagglutinin und die Neuraminidase aus virusspezifischen Proteinen aufgebaut sind, besteht die wirtsspezifische Komponente aus Kohlehydrat und ist offenbar noch mit dem Virusprotein verbunden (18).

Elektronenoptisch lassen sich die Spikes nach Laver et al. (18) wie folgt charakterisieren: Die Hämagglutinine sind stäbchenförmige Partikel, die ca. 40 A breit und 140 A lang sind. Die Neuraminidase, ein Stäbchen von 85 A Länge und 50 A Breite, besitzt zusätzlich an einem zentral angehefteten, 100 A langen Faden ein knopfähnliches Gebilde mit einem Durchmesser von 40 A. Das Hämagglutinin und die Neuraminidase sind mit ihrem hydrophoben (lipophilen) Ende in der Lipidoberfläche des Virus eingebettet. Dieses hydrophobe Ende der beiden Aktivitäten bewirkt, daß beide, wenn sie vom Virus losgelöst sind, isoliert zusammenkommen und sich an diesem Ende zu Polymeren verdichten. Hierbei bilden die Hämagglutinine Büschel von strahlenförmigen Stäbchen. Die Neuraminidaseeinheiten vereinigen sich mit den Knöpfen ihrer Schwänze, die das lipophile Ende darstellen, zu Gebilden, die samentragenden Löwenzahnköpfen ähneln. Es können auch gemischte Polymere entstehen.

Im Inneren des Virus sitzt als fadenförmige, gut von den anderen Strukturen abgesetzte Komponente das helikale Nukleokapsid, auch G- oder S-Antigen genannt. Es besteht aus Eiweiß und Ribonukleinsäure und wird daher auch als Ribonukleoproteid-Antigen (RNP-Antigen) bezeichnet. Der Durchmesser der Helix beträgt 9 nm.

2,1.4 Variationen des Pferdeinfluenzavirus

Nach der Entdeckung der Virusnatur der Pferdeinfluenza nahm man zunächst an, daß der Erreger sereologisch einheitlich vorliegt. Auf sereologische Unterschiede wurde man erstmals 1956, durch die Arbeiten von Sovinova et al. (41) aufmerksam. Sie isolierten aus Nasenspülproben hustenkranker Pferde, über das bebrütete Hühnerei, ein Virus, das sie als Myxovirus Influenza A-equi 1, Prag 56 charakterisierten. Der zweite Serotyp wurde 1963 von Waddell et al. (43) in Miami beschrieben und als A-equi 2, Miami 63, definiert.

Die Pluralität des Pferdeinfluenzavirus wurde in der Folgezeit bestätigt und es konnten zahlreiche Virusstämme gezüchtet werden, die sich entweder dem Typ A-equi 1 oder A-equi 2 zuordnen ließen. Weitere Serotypen sind bis jetzt nicht beobachtet worden. Mit dem Prager Virusstamm sind sereologisch die Stämme Cambridge 63 (3) und Sy-München 68 (30) verwandt.

Dem Stamm Miami gehören u.a. an:
Uruguay 63 (40), Newmarket 65 (37),
Berlin 65 (6), Alfort 65 (8),
München 66 (31), sowie Switzerland 66 (26).

Während A-equi 1 eine langjährige ubiquitäre Verbreitung besitzt, breitet sich A-equi 2 in der Regel immer wellenförmig aus, was ein "Kommen" und "Gehen" dieses Virustyps mit sich bringt (23).

Auch scheint das A-equi 1 Virus virulenter und immunogener zu sein. Werden Pferde, die vorher noch nie mit einem Pferdeinfluenzavirus Kontakt hatten, mit A-equi 1 oder A-equi 2 infiziert, dann ist die Antikörperbildung gegen A-equi 1 immer stärker ausgebildet (14).

Im Verlauf der Pferdeinfluenzainfektion werden, aufgrund des komplexen antigenen Aufbaus des Virus, neutralisierende,

hämagglutinierende, komplementbindende und praezipitierende Antikörper gebildet. Die neutralisierenden Antikörper sind der Aktivität des gesamten Virions und dem Hämagglutinin, die hämagglutinationshemmenden Antikörper dem Hämagglutinin und die komplementbindenden und praezipitierenden Antikörper dem Nukleokapsid und der wirtsspezifischen Komponente zugeordnet. Die komplementbindenden Antikörper sind gruppenspezifisch, während sich die neutralisierenden und hämagglutinationshemmenden Antikörper typspezifisch verhalten.

Zum sereologischen Nachweis einer Pferdeinfluenza-Virusinfektion mit den Myxoviren A-equi 1 oder A-equi 2 wird deshalb meist der Hämagglutinationshemmungstest oder der Neutralisationstest herangezogen.

2,1.5 Beziehung des Pferdeinfluenzavirus zu anderen Influenzaviren

"Influenza A - eine Variation ohne Grenzen": so beschreibt Rockborn (35) die verschiedenen Arten und die verwandtschaftliche Beziehung der Influenza A bei Mensch und Tier.

Alle Subtypen, die zur Gruppe der Influenza A gehören, neigen zu periodischen Antigenmutationen. Neben vielen kleinen Mutationen, die durch ihre serologische Abweichung vom Prototyp des Virus charakterisiert sind, kann es aber auch zum Auftreten eines völlig neuen Virus-typs kommen.

Seit 1933 sind drei bedeutende Antigenumwandlungen bekannt. Die erste erschien 1946, als das A 1 - Virus auftrat, die zweite (A 2 - Virus) 1957 (16) und die dritte (Hong-Kong Stamm) im Jahre 1968 (42).

Wie beim Menschen, treten beim Pferd, Schwein und verschiedenen Vögeln Infektionen durch Influenza - A Viren auf (34). Nach Stuart-Harris (42), ist eine verwandt-

schaftliche Beziehung zwischen dem A 2 - Hong-Kong und dem A-equi 2 Virusstamm wahrscheinlich. Dies bestätigt eine experimentelle Infektion des Menschen mit dem Erreger der Pferdeinfluenza A-equi 2, wonach Pferde- und Menschenserum mehrere gemeinsame Antigene besitzen (16, 17), zum Beispiel das Nukleoprotein-Antigen und die Neuraminidase (12, 39). Beide Virustypen sprechen auf eine Chemotherapie mit 1-Adamantanamin- HCl an (10).

In der Zeit der Grippe-Epidemie, 1889, wurde von zahlreichen Ausbrüchen der Pferdeinfluenzainfektion berichtet (29). 1957 konnten, vor Ausbruch der Epidemie, in Seren von Personen, mit Jahrgängen vor 1890, signifikante HAH-Titer gegen den A-equi 2, Milford 63 (24) und gegen den Hong-Kong 68 (21) Virusstamm nachgewiesen werden. Musurel und Mulder (1966) stellen das A-equi 2 Virus, das 1963, fünf Jahre vor dem Erscheinen des menschlichen Virus auftrat, als eine Variation des im Jahre 1889-1890 aufgetretenen Virus dar. (34).

Die Möglichkeit, daß menschliche Influenzaviren Ursache von tierischen Krankheiten sind, gewinnt immer mehr an Bedeutung. So bemüht man sich, die Pathogenität des Hong-Kong 68 Stammes des menschlichen Typ A 2 in Pferden zu bestimmen (15, 17). Wochlachsowska wies in 51 % untersuchter Pferdeseren Antikörper gegen menschliche A 2 Viren nach. Das A-equi 2 Virus ist jedoch unfähig, unter natürlichen Bedingungen im Menschen eine Krankheit hervorzurufen. Daher bleiben Tierpfleger, die mit den kranken Pferden in ständigem Kontakt stehen, frei von irgendwelchen Krankheitserscheinungen (20).

Die Influenza-A Viren von Mensch und Pferd zeigen auch enge verwandtschaftliche Beziehung zu den Influenza-A Viren des Schweines. Coen (1919) berichtet darüber (34). Die Tatsache, daß Pferdeinfluenzaviren bei Mensch, Rind und Schwein vorkommen können, ist für die indirekte Virusübertragung auf das Pferd von Bedeutung (36).

2,2 Immunisierungsvorgänge bei der Pferdeinfluenza

2,2.1 Aktiv erworbene Immunität im Verlaufe einer natürlichen Infektion

Pferde, die sich mit den Erregern A-equi 1 oder A-equi 2 auseinandersetzen, können entweder erkranken oder subklinisch durchseuchen. In beiden Fällen bildet sich im Anschluß an die Infektion eine mehr oder weniger lang anhaltende Immunität aus, welche die Tiere vor einer Reinfektion schützt (23). Die Immunität ist stets typspezifisch ausgebildet, d.h. sie ist immer nur gegen den einen Virustyp ausgerichtet, mit dem sich das Pferd auseinandersetzen mußte. Da zwischen den beiden Erregern A-equi 1 und A-equi 2 keine Kreuzimmunität besteht, decken sich die beiden typspezifischen Immunitäten gegenseitig nicht ab.

Daß eine Immunität erworben wird, beweisen serologische Untersuchungen (Anstieg spezifischer Antikörper), Kreuzimmunitätsteste, sowie auch allgemeine praktische Erfahrungen.

Gerber berichtet von einer Hustenepidemie, bei der von 2 000 Pferden lediglich die Tiere verschont blieben (80 Tiere), welche schon einmal erkrankt waren (13). Nach Pape (27) besitzen Pferde, welche ein Jahr vorher die Krankheit durchgemacht haben, einen wirksamen Schutz gegen eine Wiedererkrankung.

Als Ausdruck der Immunitätsbildung erschienen im Serum der Tiere spezifische Antikörper. Ein Serumtiter von $> 1:20$ gilt als beweisend für eine überstandene Infektion. Die Titer schwanken von Tier zu Tier sehr erheblich. Während die komplementbindenden Antikörper schon eine Woche nach der Infektion nachgewiesen werden können, erscheinen die hämagglutinationshemmenden Antikörper erst 12 - 15 Tage nach der Infektion. Etwa 12 - 14 Tage nach der Erkrankung erreichen die HAH-Titer ihre Höchstwerte

Sie können bis $> 1:1000$ ansteigen, schwanken dabei aber in großen Grenzen. 30 zwei Jahre alte Pferde, die vor der natürlichen Infektion serologisch negativ waren, hatten 13 Tage nach der Erkrankung Titer gegenüber A-equi 1, Lexington 63, die zwischen $1:40$ und $1:1280$ schwankten. Daß der Titer auf das über 30fache ansteigt, ist keine Seltenheit. Tiere, die bereits über Titer $> 1:40$ verfügen, reagieren serologisch auf eine Reinfektion nicht bis nur gering (11). Nach Bryans et al. (9) sprechen Titer $> 1:20$ für eine belastbare Immunität.

Über die Dauer des Persistierens der humoralen Immunität gehen die Meinungen auseinander. Dies liegt hauptsächlich daran, daß sich die Tiere unter natürlichen Bedingungen immer wieder neu infizieren und dadurch den Antikörperstatus verlängern. Echte Aussagen über das Persistieren von Antikörpern nach einer einmaligen natürlichen Infektion könnten nur dann gemacht werden, wenn man die Tiere sofort nach der Infektion so lange in Quarantäne halten würde, bis die Antikörpertiter verschwunden sind.

Die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Immunität nimmt entsprechend dem Alter der Tiere zu. Dies ist insbesondere bei den Rennbahnponies der Fall (11). Hauptsächlich werden 2-jährige und jüngere Pferde infiziert, wobei die Ausbildung einer Immunität gewöhnlich vor ihrem dritten Lebensjahr erreicht ist. Daher beschränken sich bei Seuchenausbrüchen die Erkrankungen meistens auf jüngere Tiere.

Die Immunitätsdauer nach einer einmaligen natürlichen Überstandenen Infektion ist nicht einwandfrei geklärt. Die Gründe hierfür wurden bereits vorher angesprochen. Nach den praktischen Erfahrungen ist die Immunität aber nicht sehr dauerhaft. Nach Mayr (23) soll sie, ähnlich wie bei der Grippeerkrankung des Menschen, innerhalb

eines Jahres wieder verschwinden. Nach Espmark sind Reinfektionen mit dem homologen Virus, aufgrund seiner sereologischen Erfahrungen, im Verlaufe von 2 - 3 Jahren möglich (4).

Nach Beveridge et al. (2) erscheinen die komplementbindenden Antikörper nach einer Infektion etwas früher in der Blutbahn als die hämagglutinationshemmenden und neutralisierenden Antikörper. Sie persistieren aber nicht so lange. In der Regel verschwinden sie nach 2 - 3 Monaten. Der Nachweis komplementbindender Antikörper im Blut kann deshalb diagnostisch für eine nicht zu lange zurückliegende akute Infektion verwendet werden.

2,2.2 Aktiv erworbene Immunität nach Schutzimpfung

Um die Unannehmlichkeiten des Hoppegartener Hustens in Zeiten höchster Infektionsgefahr (Reitturniere, Pferderennen und Auktionen) zu vermeiden, wurden Impfstoffe entwickelt, die den Pferden einen wirksamen prophylaktischen Schutz geben sollen (5, 13). Diese Impfstoffe, die analog der Gripeschutzimpfung des Menschen im In- und Ausland hergestellt werden, richten sich gegen beide Typen des Pferdeinfluenza-Virus: Typ A-equi 1 und A-equi 2. Man bezeichnet Impfstoffe dieser Art als polyvalent. Ein derartiger Impfstoff besteht aus inaktivierten Erregern und bestimmten Zusatzstoffen, die der Verbesserung der Wirksamkeit dienen (23). Die Reaktion des Körpers auf die Einverleibung des Impfstoffes äußert sich in der Bildung von spezifischen Serumantikörpern, die die Grundlage des humoralen Schutzes darstellen. Diese Antikörperbildung wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dabei muß man unterscheiden zwischen Faktoren die im Impfstoff liegen und Faktoren, die durch die Art der Applikation variieren können.

Als wichtigste Impfstoff-Faktoren sind bekannt (9):

- a) die antigene Qualität des Virus
- b) die injizierte Antigenmenge
- c) das Lösungsmittel, in dem die Virusantigene suspendiert sind
- d) das Adjuvans
- e) sonstige Begleitstoffe

Die Reaktionslage des Impflings ist für die Immunitätsbildung von ausschlaggebender Bedeutung. Gerade beim Pferd gibt es sogenannte "gute" und "schlechte" Immunitätsbildner. Daneben kommen gelegentlich immer wieder Tiere vor, die überhaupt keine Immunität zu bilden vermögen (z.B. ererbte A-Gammaglobulinämie).

Auch die Art der Applikation kann sich auf den Immunisierungseffekt auswirken. Zwischen der subcutanen und intramuskulären Injektion bestehen grundsätzlich keine Unterschiede. Es ist jedoch von Bedeutung, an welcher Stelle geimpft wird, da die Resorptionsverhältnisse unterschiedlich sein können und dadurch indirekt einen Einfluß auf die Immunitätsbildung auszulösen vermögen. Wird bei der parenteralen Injektion gleichzeitig auch Impfstoff intracutan injiziert, was gelegentlich immer wieder vorkommt, so kann dies ebenfalls die Immunitätsbildung beeinflussen.

Die Applikation des Impfstoffes erfolgt üblicherweise parenteral, i.m., seitlich am Hals.

30 Tage (1, 19) nach der 1. Impfung erreichen die hämagglutinierenden Antikörper ihr Titermaximum. Auf dieser Höhe halten sie sich etwa bis zum 60. Tag. Nach 60 bis 75 Tagen sinken die Serumantikörper wieder ab und nähern sich nach etwa 2 - 3 Monaten dem Ausgangswert (23).

Die relativ kurze Periode der humoralen Immunität kann

durch eine 2. Impfung verlängert werden. Die Wiederholungsimpfung führt zu einem Boostereffekt. Dieser äußert sich dadurch, daß die Titer nach der 2. Impfung wesentlich höhere Werte als nach der Erstimpfung erreichen und vor allen Dingen länger persistieren. Etwa 14 - 15 Tage nach der 2. Impfung erreichen die Serumantikörper ihre höchsten Werte. Sie persistieren in dieser Höhe über 30 Tage und fallen dann nur langsam wieder ab. Nach der Zweitimpfung darf man unter natürlichen Verhältnissen mit einer Immunitätsdauer von ca. 1 Jahr rechnen (32). Sind bei Pferden schon vor der Impfung Titer gegen A-equi 1 oder A-equi 2 nachweisbar, so kann bereits die erste Impfung im Sinne eines Boostereffektes wirken, während die 2. Impfung dann keine wesentliche Verbesserung mehr bringt.

Nach Haltermann (14) entstehen die höchsten Antikörperwerte, wenn die 2. Impfung 12 Wochen nach der 1. Impfung erfolgt. Nach Mayr (23) sollte die 2. Impfung frühestens 4 und spätestens 10 Wochen nach der 1. Impfung vorgenommen werden.

Ackermann (1) hat nach Verimpfung von inaktiviertem Pferdeinfluenza-Virus folgende Werte ermittelt. Bei 12 geprüften Impfpferden stiegen die Titer gegen A-equi 1 von 1:136 nach der 1. Impfung auf 1:573 nach der 2. Impfung an und gegen A-equi 2 von 1:10 nach der 1. Impfung auf 1:237 nach der 2. Impfung. Diese Meßwerte lagen dabei 4 Wochen nach der Erstimpfung und 3 Wochen nach der Zweitimpfung.

Nach allen bisherigen Untersuchungen scheint die Immunität bei Pferden nach einer auf zwei Impfungen aufgebauten Erstimmunisierung unter natürlichen Bedingungen nicht länger als 1 Jahr anzuhalten. Aus diesen Gründen hat es sich in der Praxis eingebürgert, derartig vorgeimpfte Tiere jedes Jahr vor Beginn der "Hustenzeit" nachzuimmunisieren. Dabei wurde bis jetzt nur einmal geimpft. Nach Pressler (33) sollte jedoch auch die jährliche Nachimmunisierung in Form von zwei Impfungen, die im Ab-

stand von 60 Tagen durchzuführen wären, vorgenommen werden. Mit dieser Methode werden noch höhere Antikörperwerte, als nach der 2. Impfung im Rahmen der Erstimmunisierung erreicht.

Nach Pressler (33) fallen die Antikörpertiter bei der Revaccination, wenn sie nur in Form einer einmaligen Impfung durchgeführt wird, schon vor einem Jahr ab. Die hämagglutinationshemmenden Antikörper gegen A-equi 1 nähern sich etwa nach 180 Tagen und die gegen A-equi 2 schon nach 60 Tagen den praeexistierenden Antikörperwerten vor der Revaccination. Wird dagegen die jährliche Reimmunisierung ebenfalls mit 2 Impfungen durchgeführt, dann persistieren die Antikörpertiter über ein Jahr, also länger als nach der Erstimmunisierung.

2,2.3 Natürlich erworbene, passive Immunität

Daß eine aktive Immunität gegenüber Pferdeinfluenza passiv, auf natürliche Weise erworben werden kann, beweisen folgende Untersuchungen: Muriel (25) fand im Blut und Kolostrum von vier Stuten, die sich kurz vorher mit dem Erreger A-equi 2 auseinandergesetzt hatten, Antikörper gegen diesen Virustyp. Gleichzeitig testete er ein Fohlen vor dem ersten Säugen und zwei Tage später. Während im Blut des Fohlens vor dem ersten Säugen keine Antikörper gegen A-equi 2 nachweisbar waren, enthielt die Blutprobe zwei Tage darauf einen HAH-Titer von 1:120 gegen den Erreger A-equi 2. Damit ist bewiesen, daß die Immunität gegenüber dem Pferdeinfluenza-Virus beim Pferd auf natürliche Weise passiv übertragen werden kann. Sie ist ebenfalls typspezifisch. Eine Übertragung während der Trächtigkeit erfolgt wegen der Plazentastruktur der Stute nicht.

Auf obige Weise passiv immunisierte Fohlen sind ca. 3 - 4 Monate gegen eine Pferdeinfluenzaerkrankung geschützt.

2,2.4 Künstlich erworbene passive Immunität

Eine passive, künstliche Immunisierung gegen Pferdeinfluenza ist sehr problematisch. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Es ist nicht nur das Serotypenproblem, sondern vor allem die Frage nach der effektiven Wirksamkeit humoraler Antikörper gegenüber der Pferdeinfluenzainfektion. Da sich das erste Infektionsgeschehen immer an den Schleimhäuten abspielt, kann eine passive Immunisierung die Ansiedlung des Erregers nicht verhindern. Eine humoral aufgebaute, künstlich erworbene passive Immunität verschwindet i.R. schon nach 14 Tagen, sodaß ein an den Schleimhäuten angesiedeltes Virus, sofern es solange persistiert, dann aktiv werden kann.

Über praktische Erfahrungen mit einer Immunserumbehandlung und Prophylaxe liegen kaum Berichte vor. Hohe Immunserumdosen erwiesen sich weder im Kontaktinfektionsversuch noch im Infektionsversuch nach künstlicher Applikation als wirksam.

2,3 I m p f s t o f f e g e g e n d i e P f e r d e - i n f l u e n z a

2,3.1 Allgemeines

Wie die menschlichen Influenzaviren, wirken auch die Pferdeinfluenzaviren antigen und führen im Verlaufe ihrer Infektion beim befallenen Wirt zu einer Immunitätsbildung. Diese Eigenschaften behalten die Viren auch bei, wenn sie schonend mit bestimmten Verfahren inaktiviert werden.

Von dieser Tatsache ausgehend wurden, in Analogie zur Gripeschutzimpfung des Menschen, auch Impfstoffe gegen die Pferdeinfluenza entwickelt. Bei allen Impfstoffen handelt es sich um polyvalente Vaccinen, die mindestens einen immunisierenden Antigenkomplex gegen jeden Serotyp, häufig sogar mehrere, enthalten.

Die Pferdeinfluenza-Vaccinen lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

1. in Lebendimpfstoffe und 2. in Impfstoffe aus inaktivierten Erregern. Bei letzteren hat man wiederum zu unterscheiden zwischen Ganzimpfstoffen und sog. Spaltimpfstoffen.

2,3.2 Lebendimpfstoffe

Mit der Herstellung von Lebendimpfstoffen haben sich vor allem russische Forschergruppen beschäftigt. Die Lebendimpfstoffe enthalten ein für ein Pferd schwach virulentes, vermehrungsfähiges Virus. Es handelt sich dabei um Feldstämme, die über das bebrütete Hühnerei angezüchtet und in der Allantoishöhle in Passagen weitergeführt werden. Teilweise werden die Impfstämme auch in Gewebekulturen vermehrt.

Die Applikation der Lebendimpfstoffe erfolgt in der Regel intranasal oder via Aerosol.

Durchsetzen konnten sich die Lebendimpfstoffe bis jetzt nicht. Die Immunitätsbildung, vor allem auf humoraler Basis, ist nicht so stark ausgebildet, wie dies bei subcutan injizierten inaktivierten Impfstoffen der Fall ist. So führen subcutan verimpfte Antigenvaccinen zu einer Immunität von 60 - 80 %, während intranasal applizierte Lebendimpfstoffe nur eine Immunität von etwa 50 - 60 % erreichen. (15). Nach Hoyle (15) ist die Immunisierung mit vermehrungsfähigem Virus ungefährlich, jedoch bezüglich ihrer Wirkung inkonsequent und unbedeutend.

2,3.3 Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

Die Antigenimpfstoffe haben sich im Gegensatz zu den Lebendvaccinen allgemein durchgesetzt. Es handelt sich um polyvalente Impfstoffe aus inaktiviertem Virus,

das i.R. in bebrüteten Hühnereiern (Allantoishöhlenbeimpfung) vermehrt wird. Zur Verbesserung der Wirksamkeit enthalten die Impfstoffe neben dem Virusantigenkomplex folgende Zusatzstoffe:

1. Adsorbentien und Adjuvantien zur Steigerung der antigenen Wirksamkeit (32, 38).
2. Konservierungsmittel zur Verbesserung der Haltbarkeit.
3. Suspensionsvermittler und Entschäumer zur Verbesserung der Löslichkeit.

Der Virus-Antigenkomplex kann in den Vaccinen unterschiedlich vorliegen: Im intakten Viruspartikelchen (Virion) vereint oder in Form des aufgespaltenen Virions. Entsprechend unterscheidet man zwei Arten von Pferdeinfluenza-Impfstoffen aus inaktivierten Erregern:

1. Ganzimpfstoffe und 2. Spaltimpfstoffe

Bei den Ganzimpfstoffen wird das nicht zerteilte Virion in üblicher Weise mit Formalin oder anderen chemischen Inaktivierungsmitteln schonend, teilweise auch mit Wärme inaktiviert. Bei den Spaltvaccinen wird das Virus durch eine kombinierte Behandlung mit Tween-80 und Äther in seine Hauptkomponenten zerlegt und verliert dabei seine Infektiosität. Die Spaltprodukte behalten aber ihre Antigenität, welche, wie bei den Ganzimpfstoffen, durch Zusatz bestimmter Adjuvantien gesteigert wird (19, 32).

Als Vorteil der Spaltimpfstoffe gegenüber den Ganzimpfstoffen diskutiert man eine Verbreiterung des antigenen Spektrums und den Verlust der pyrogenen und toxischen Aktivität (23).

Nach Maess et. al. (19) führen Spaltimpfstoffe schneller zu hohen Antikörpertitern im Blut als Ganzimpfstoffe. Wie weit Spaltimpfstoffe besser als Ganzimpfstoffe immunisieren, ist noch durchaus strittig. Als Hauptvorteil der Spaltimpfstoffe wird deshalb mehr die Unschädlichkeit dieser Impfstoffe herausgestellt. Das

Influenzavirus verfügt über pyrogene und toxische Begleitstoffe, die zu postvaccinalen Komplikationen bei Impfungen führen können. Außerdem enthält es eine wirtsspezifische Komponente (z.B. Eialbumin), die allergische Reaktionen nach der Impfung auszulösen vermag. Bei den Ganzvaccinen kann man zwar, durch entsprechende Behandlung des Virusausgangsmaterials, das vor allem für eine postvaccinale Allergie verantwortliche Fremdeiweiß weitgehend beseitigen. Die im nicht gespaltenen Virion enthaltenen Toxine, Pyrogene und Hämolsine bleiben jedoch erhalten. Bei den Spaltvaccinen werden diese Schadkomponenten durch die Ätherbehandlung herausgelöst, ohne daß die immunisierende Kraft der Vaccinen darunter leidet.

Aus der Tab. 2 ist der unterschiedliche Gehalt an aktiven, virusspezifischen und wirtsspezifischen Komponenten im Vergleich zu kompletten, infektiösen Viruspartikelchen bei Ganz- und Spaltimpfstoffen ersichtlich.

Das in den Ganzimpfstoffen enthaltene, inaktivierte Virus unterscheidet sich von dem vermehrungsfähigen, infektiösen Virus praktisch nur durch den Verlust seiner Infektiosität. Alle anderen antigenen, toxischen, pyrogenen und hämolysierenden Aktivitäten sind erhalten. In den Spaltimpfstoffen fehlen demgegenüber neben der Infektiosität die Toxizität, die Pyrogenität und die Haemolyse-Aktivität.

Auch bezüglich chemischen Aufbaus gleicht das im Ganzimpfstoff enthaltene inaktivierte Virus dem infektiösen Erreger. Im Gegensatz hierzu fehlen den Spaltimpfstoffen weitgehend die wirtsspezifischen Eiweiße und die lipoidhaltigen Komponenten des Virus.

Bezüglich Gehalt an virusspezifischen Antigenen unterscheiden sich die beiden Impfstoffarten nicht. Alle zwei Impfstoffarten stimulieren die Bildung von neutralisierenden, hämagglutinationshemmenden und komplementbindenden Antikörpern.

2,4 Postvaccinale Komplikationen

Postvaccinale Komplikationen in Anschluß an Influenza-impfungen kommen vor, sind aber prozentual nicht gravierend. Genaue statistische Angaben liegen nicht vor.

Nach der Genese lassen sich die postvaccinalen Komplikationen in zwei große Gruppen einteilen:

1. Komplikationen, die durch die Impfstoffe bedingt sind
und
2. Komplikationen, die technisch bedingt sind.

Zur Gruppe 1 zählen die Impferkrankungen, die Impfdurchbrüche und die Impfschäden.

Impferkrankungen kommen sehr selten vor. Der Grund für eventuelles Auftreten ist eine unzureichende Inaktivierung des Erregers. Die ebenfalls selten auftretenden Impfdurchbrüche werden durch schlecht immunisierende Virusstämme in der Vaccine, durch mangelnde Antigenqualitäten, durch fehlende Serotypen durch falsche Inaktivierungen, aber auch durch zu geringe Impfmengen verursacht. Nicht zu den Impfdurchbrüchen darf man die Erkrankungsfälle rechnen, welche durch Reinfektionen in einer Zeit auftreten, zu der die Immunität bereits erloschen ist.

Wesentlich häufiger sind die durch Impfstoffe hervorgerufenen Impfschäden. Sie lassen sich unterteilen in

1. Allergien,
 2. Störung der Trächtigkeit,
 3. Lokalreaktionen,
- und 4. sonstige Reaktionen

Bei den Allergien unterscheidet man humorale Allergien (Soforttyp) und zelluläre Allergien (Spättyp). Letztere sind außerordentlich selten. Sie lassen sich schwer vermeiden, da sie mit der immunisierenden Komponente

des Virusantigens gekoppelt sind. Anders verhält es sich mit den Allergien vom Soforttyp. In nicht gereinigten Vaccinen werden sie hauptsächlich durch das im Impfstoff enthaltene fremde Hühnereiweiß hervorgerufen, sind also sog. Hühnereiweiß-Allergien. Um diese Komplikation zu vermeiden, werden die Impfstoffe von dieser Fremdeiweißkomponente gereinigt. Klinisch äußert sich die humorale Allergie in Form einer Urtikaria, die über den ganzen Körper verstreut auftritt, in Oedemen und in extremen Fällen auch durch anaphylaktische Erscheinungen.

Über Impfstoff-spezifische Verfohlungen ist wenig bekannt. Einige beobachtete Fälle können auch durch die Aufregung beim Impfakt hervorgerufen sein. Wieweit die pyrogenen und toxischen Komponenten in Ganzimpfstoffen zu Verfohlungen führen können, ist ebenfalls unbekannt.

Die pyrogenen und toxischen, vom Virus stammenden Aktivitäten in den Ganzimpfstoffen können in extremen Fällen zu Fieber, Störungen des Allgemeinbefindens und gelegentlich ebenfalls zu Allergien führen.

Zu den Lokalreaktionen rechnet man alle, kurz nach der Impfung an oder um die Impfstellen auftretenden pathogenen Reaktionen. Sie äußern sich als Entzündungen mit Schmerzen, Verdickungen von derber Konsistenz, Abszeßbildung usw. Lokalreaktionen werden im Anschluß an Pferdeinfluenzaimpfungen relativ häufig beobachtet. Sie sind sehr von der Art des Impfstoffes abhängig.

Sonstige Reaktionen wie Mattigkeit und Appetitlosigkeit können entweder allein oder im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Impfschäden auftreten.

Als Ursache für die Impfkomplicationen können die unterschiedlichsten Komponenten im Impfstoff direkt und indirekt verantwortlich sein. Immer handelt es sich aber bei einem Impfschaden um ein komplexes Geschehen, an dem die Abwehrlage und die Immunitätsbildungsfähigkeit des Wirtes maßgebend beteiligt sind. So ist es auch verständlich, daß ein und derselbe Impfstoff bei tausend Tieren zu keinerlei postvaccinalen Reaktionen führt, während 1-2 Einzeltiere Schaden erleiden.

Als Allergie auslösende Komponenten können folgende Bestandteile des Impfstoffes wirken: Fremdeiweiß, Pyrogene und Toxine des Virus, Adjuvantien und Lösungsvermittler sowie auch Antibiotika. Diese Komponenten können auch gelegentlich zu anaphylaktischen Reaktionen und zu sonstigen Allgemeinstörungen führen. Durch eine entsprechende Herstellung der Impfstoffe kann ein Teil dieser Schäden verhindert werden.

An der Entstehung von Lokalreaktionen ist häufig das im Impfstoff enthaltene Adjuvans oder Adsorbens schuld. Der Impfstoffhersteller befindet sich hier in etlichen Schwierigkeiten. Adjuvantien, welche die Antikörperbildung besonders gut stimulieren, sind auch sehr stark reaktiv und führen zu Entzündungen und Schwellungen an der Impfstelle. Umgekehrt können Lokalreaktionen aber auch technisch durch unsteriles Arbeiten und falsche Injektionsstelle bedingt sein.

2,5 Methoden zur Prüfung von Influenzavaccinen

2,5.1 Allgemeines

Jede Vaccine muß, bevor sie in den Handel kommt, entsprechend auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit geprüft sein. In der Regel haben die einzelnen Länder hierfür staatliche Prüfungsvorschriften erlassen, die in Form von Mindestanforderungen festlegen, welche Mindestbe-

dingungen ein Impfstoff erfüllen muß, damit er für die Impfung freigegeben werden darf. Daneben müssen die Impfstoffe jedoch stets die sog. "firmeneigenen" Prüfungen durchlaufen, in denen die Mindestanforderungen über den gesetzlich vorgeschriebenen liegen.

Die Prüfungsbestimmungen für Impfstoffe aus inaktivierten Erregern und Lebendimpfstoffe sind unterschiedlich. Bei den Lebendimpfstoffen wird das Hauptgewicht der Prüfung auf den Nachweis der Unschädlichkeit der Impfstoffe gelegt. Bei den Impfstoffen aus inaktivierten Erregern liegt der Schwerpunkt der Prüfung jedoch auf dem Nachweis der Wirksamkeit.

Da Lebendimpfstoffe bei der Pferdeinfluenza kaum verwendet werden, beziehensich folgende Ausführungen hauptsächlich auf die Prüfung von Impfstoffen aus inaktivierten Erregern.

Für die Wirksamkeits- und Unschädlichkeitsprüfungen müssen entsprechende Proben gezogen werden. Dabei unterscheidet man Proben aus den einzelnen Herstellungsschritten und Proben des versandfertigen Impfstoffes. Das jeweilige Stichprobenvolumen richtet sich nach der Menge der jeweiligen Impfstoffcharge.

2,5.2 Prüfung auf Unschädlichkeit

Die Unschädlichkeitsprüfung wird nach den Bestimmungen des National Institute of Health, die auch für die menschlichen Grippeimpfstoffe gelten, durchgeführt (1). Sie teilt sich in folgende Prüfungsabschnitte auf:

1. Verträglichkeitsprüfung beim Pferd.
2. Nachweis pyrogener und toxischer Stoffe im Versuchstier.
3. Nachweis auf Freisein von Bakterien und Pilzen.
4. Nachweis auf Freisein von vermehrungsfähigem Influenzavirus und von Fremdviren.

2,5.2.1 Verträglichkeitsprüfung beim Pferd

Bei der Verträglichkeitsprüfung am Pferd unterscheidet man eine lokale und eine allgemeine Verträglichkeit. Hierzu werden Pferde mit verschiedenen Dosen (bis 10fache Dosis) in der üblichen Weise, i.m., seitlich am Hals, geimpft. Danach kontrolliert man ca. 14 Tage auf eventuell auftretende Impfreaktionen, die sich als lokale Veränderungen an der Injektionsstelle, als Allergien und gestörtes Allgemeinbefinden äußern können.

2,5.2.2. Nachweis pyrogener und toxischer Stoffe im Versuchstier

Da die Untersuchungen am Pferd sehr kostspielig sind, werden die Impfstoffe im kleinen Versuchstier auf das Vorhandensein pyrogener und toxischer Stoffe getestet. Hierzu eignen sich insbesondere Kaninchen, Meerschweinchen, Frettchen und Mäuse.

Der Impfstoff wird in verschiedenen hohen Dosen intraperitoneal, intramuskulär, intravenös oder subcutan verimpft. In der folgenden Beobachtungszeit achtet man auf eventuell auftretende Todesfälle, verändertes Allgemeinverhalten, Allergien und lokale Reaktionen. Besonders wichtig ist hierbei der sog. Pyrogen-Test beim Kaninchen, bei dem i.R. automatisch im Anschluß an die Injektion die Erhöhungen der Temperatur registriert werden. Nach Abschluß der Versuche und der Beobachtungszeit werden die Tiere getötet und pathologisch-histologisch untersucht.

2,5.2.3 Nachweis auf Freisein von Bakterien und Pilzen

Die bakteriologischen und mykologischen Untersuchungen richten sich nach den üblichen, bei jeder Impfstoffprüfung verwendeten Verfahren. Sie sind heute weitgehend standardisiert.

2,5.2.4 Nachweis auf Freisein von vermehrungsfähigem Influenzavirus und auf Fremdviren

Für den Nachweis auf vermehrungsfähige Influenzaviren und Fremdviren, kann man die Impfstoffe in fertiger Form oder auch gereinigt und vorbehandelt verimpfen. Häufig stören die Begleit- und Hilfsstoffe bei dem Nachweis von vermehrungsfähigem Virus. Am unempfindlichsten hierfür ist das 10 Tage bebrütete Hühnerei. Es wird deshalb hauptsächlich für diese Prüfungen verwendet. Die Impfstoffe oder ihre Zubereitungen werden in einer Menge von 0,2 ml/Ei in die Allantoishöhle geimpft. Die Hühnerembryonen werden danach entsprechend bebrütet und nach den bekannten Verfahren auf die Vermehrung von Viren kontrolliert.

Nach dem Hühnerembryo können auch Zellkulturen in die Prüfung eingeschlossen werden. Sie dienen weniger dem Nachweis von nicht inaktivierten Influenzaviren als vielmehr dem Nachweis einer Fremdvirus-Kontermation. Bei den Zellkulturen stören die Begleit- und Hilfsstoffe besonders stark.

2,5.3 Prüfung auf Wirksamkeit

2,5.3.1 Allgemeines

Unter Wirksamkeit eines Impfstoffes versteht man seine Fähigkeit, im Impfling nach einer bestimmten Zeit einen spezifischen Schutz zu erzeugen, der eine gewisse Zeit den Impfling vor einer Erkrankung schützt. Da i. R. dieser Schutz komplex aufgebaut ist und aus unterschiedlichen Mechanismen besteht, ist die Prüfung dieses Schutzes sehr schwierig.

Bei der Pferdeinfluenza beruht der Immunschutz

1. auf humoralen Mechanismen (Antikörperbildung) und
2. auf zellulären Abwehrvorgängen.

Die Wirksamkeit eines Pferdeinfluenza-Impfstoffes bezüglich Antikörperstimulierung läßt sich relativ einfach durchführen. Sie kann vorgenommen werden im Pferd und im kleinen Versuchstier. Da Pferdeversuche sehr teuer sind, werden mehr und mehr kleine Versuchstiere in diesen Abschnitt der Wirksamkeitsprüfung eingeschaltet.

Die Prüfung der zellulären Abwehrvorgänge ist wesentlich schwieriger. Hier hilft man sich insofern, als man im "Kreuzschutzttest" die durch den Impfstoff erzeugte Immunität in ihrer Gesamtheit gegenüber einer Testinfektion prüft. Im Idealfall werden für die Kreuzschutztteste Pferde eingesetzt. Aber auch hier kann man kleine Versuchstiere verwenden, wenn man die zur Testinfektion benutzten Virusstämme so auf die jeweiligen Versuchstiere adaptiert hat, daß es nach der Testinfektion bei den Kontrolltieren zu deutlich erkennbaren Krankheitserscheinungen kommt.

Entsprechend obigen Gegebenheiten muß man bei den Wirksamkeitsprüfungen von Pferdeinfluenza-Impfstoffen unterscheiden zwischen:

1. Wirksamkeitsprüfung im Versuchstier.
2. Wirksamkeitsprüfung im Pferd.

2,5.3.2 Wirksamkeitsprüfung im Versuchstier

Die Wirksamkeitsprüfung im Versuchstier gliedert man in a) Kreuzschutzttest

- b) Nachweis der Bildung von Antikörpern.

Als Versuchstier verwendet man üblicherweise Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse und Frettchen.

2.5.3.2.1 Kreuzschutzttest

Der Kreuzschutzttest wird in der Weise vorgenommen, daß die Vaccine, in abgestuften Dosen, jeweils einer bestimmten Zahl von Versuchstieren appliziert wird. Nach 3 - 4 Wochen werden die so vorgeimpften Tiere dann einer einheitlichen Testinfektion ausgesetzt. Nicht geimpfte Versuchstiere dienen als Kontrolle.

Voraussetzung für diesen Test im Versuchstier ist, daß für das entsprechende Versuchstier virulente Pferdeinfluenzastämme zur Verfügung stehen. Der Immunschutz, den eine Vaccine im Versuchstier aufbaut, kann deshalb nur gegen die auf die Versuchstiere adaptierten Pferdeinfluenzastämme geprüft werden. Das Problem dieser Testungen liegt deshalb darin, daß ständig die Frage im Raume steht, ob und welche Analogieschlüsse vom Versuchstier zum Pferd gezogen werden können.

2.5.3.2.2 Antikörpernachweis

Für den Antikörpernachweis werden bestimmte Gruppen von Versuchstieren mit bestimmten Impfdosen geimpft und anschließend in verschiedenen Zeitabständen die Antikörperbildung in ihnen untersucht. Dabei werden folgende Kriterien getestet:

1. Beginn der Antikörperbildung
2. Art der Antikörperbildung
3. Menge der Antikörper
4. Höhepunkt der Antikörperbildung
5. Dauer der Antikörperpersistenz

Als Verfahren kann man verwenden:

1. den Neutralisationstest
2. die Komplementbindungsreaktion
3. den Hämagglutinationshemmungstest.

Da der Hämagglutinationshemmungstest sehr einfach und zeitsparend durchgeführt werden kann, andererseits die Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper ein sehr

guter Maßstab für die Ausbildung der humoralen Immunität ist, wird in der Praxis für die Antikörperuntersuchung hauptsächlich der Hamagglutinationshemmungstest verwendet.

Als Versuchstiere haben sich in den einzelnen Impfstoff-firmen unterschiedliche Tierarten eingebürgert. Im allgemeinen werden Kaninchen, Meerschweinchen, Mäuse und Frettchen verwendet.

Die Untersuchung der Antikörperbildung erstreckt sich einmal auf den Nachweis des Antigens und den Verlauf der Antikörpertiter nach einer einmaligen Impfung und zum anderen auf die Untersuchung des durch eine zweite darauffolgende Impfung verursachten Boostereffektes. Beide Untersuchungsreihen werden getrennt voneinander durchgeführt und nur aus der Bewertung beider Ergebnisse läßt sich auf die Wirksamkeit einer Pferdeinfluenza-Vaccine schließen.

2.5.3.3 Wirksamkeitsprüfung im Pferd

Auch bei der Wirksamkeitsprüfung im Pferd unterscheidet man den Kreuzschutztest und den Nachweis der Antikörperbildung.

Der Kreuzschutztest dient vor allen Dingen der Prüfung der immunisierenden Eigenschaften der verwendeten Impfstämme. Er braucht deshalb nur dann durchgeführt werden, wenn neue Virusstämme für die Vaccineproduktion benutzt werden. Bei ihnen muß vorher im Pferdeversuch nachgewiesen werden, daß sie gut immunisieren. Ist dieser Nachweis erbracht, genügt es für die laufende Produktion der Vaccine, wenn die quantitativen, antigenen Verhältnisse in der Vaccine durch die Prüfung der Antikörperbildung kontrolliert werden.

Für den Kreuzschutztest benötigt man junge, hochempfindliche Pferde und entsprechend virulente Feldvirusstämme zur Auslösung der Testinfektion. Die Antikörperuntersuchungen werden ähnlich, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben,

durchgeführt. Auch hier hat sich hauptsächlich der Hämagglutinationshemmungstest eingebürgert. Belastend wirkt sich aus, daß Pferdeseren sehr häufig Inhibitoren enthalten, die die Reaktion stören. Eine Vorbehandlung der Pferdeseren ist deshalb notwendig. Für die Ausfällung der Inhibitoren hat sich die Behandlung mit Perjodat, Hitze, Kaolin, CO_2 oder auch durch Trypsinierung bewährt. Bei all diesen Behandlungen muß man jedoch kontrollieren, ob hierdurch nicht spezifische Antikörper ausgefällt werden.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3,1 M a t e r i a l u n d M e t h o d e n

3,1.1 Impfstoffe

Es wurden 6 verschiedene Impfstoffe getestet

1. Vaccine I: Handels-Spaltvaccine, Tween-Ätherbehandlung,
Virusstämme: A-equi 1 und A-equi 2,
Adjuvans: unbekannt.
2. Vaccine II: Handels-Ganzvaccine,
Virusstämme: A-equi 1, Prag 56,
 A-equi 2, Miami 63,
Inaktivierungsmittel: Formalin,
Adjuvans: Aluminiumhydroxyd.
3. Vaccine III: Handels-Ganzvaccine,
Virusstämme: A-equi 1, Prag 56,
 A-equi 2, Lexington 63,
Inaktivierungsmittel: chemisch,
Adjuvans: unbekannt.
4. Vaccine IV: Handels-Ganzvaccine,
Virusstämme: A-equi 1, Prag 56,
 A-equi 2, Milford 63,
 A-equi 2, Miami 63,
Inaktivierungsmittel: thermisch,
Adjuvans: Delta-Aluminiumoxyd.
5. Vaccine V: Experimentelle Ganzvaccine,
Virusstämme: A-equi 1, Prag 56,
 A-equi 2, Miami 63,
 A-equi 2, Alfort 65,
Inaktivierungsmittel: unbekannt,
Adjuvans: multiple Ölemulsion.

6. Vaccine VI: Experimentelle Ganzvaccine,
Virusstämme: A-equi 1, Prag 56,
A-equi 2, Miami 63,
A-equi 2, Alfort 65,
A-2 Hong Kong,
Inaktivierungsmittel: unbekannt,
Adjuvans: multiple Ölemulsion.

3,1.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Kaninchen, Meerschweinchen und Mäuse verwendet. Alle Tiere stammten aus kontrollierten Zuchten. Sie waren gleich alt und gleich schwer (auf Tierart bezogen). Es wurden nur ausgewachsene Tiere, deren Serumtiter gegen A-equi 1, Prag 56 und A-equi 2, Miami 63 unter 1:4 lag, verwendet. Bei Kaninchen und Meerschweinchen wurde jedes einzelne Tier getestet, bei der Maus handelte es sich um ein Serumgemisch aus 3 x 10 getöteten Tieren.

Die Gesamtzahl der Kaninchen betrug 30 Tiere, aufgeteilt auf 18 männliche und 12 weibliche.

Bei den Meerschweinchen verwendeten wir nur männliche Tiere, insgesamt 60. Die Zahl der Mäuse betrug 240, sämtliche männlichen Geschlechts.

Entsprechend der Versuche wurden die Tiere in getrennten Abteilungen bzw. Stalleinheiten gehalten.

3,1.3 Impftechnik

Bei sämtlichen Untersuchungen wurden einheitlich, unabhängig von der Tierart, 1 ml der zu prüfenden Impfstoffe subcutan verimpft. Dies betrifft die Erst- wie die Wiederimpfung.

3,1.4 Blutentnahme und Narkose

Bei den Kaninchen und Meerschweinchen wurde das Blut mittels Herzpunktionen gewonnen. Die Mäuse sind nach Durchtrennung der Vena jugularis entblutet worden. Für jeden Test wurden 2 x 5 Mäuse getötet, wobei das Serum von jeweils 5 Mäusen eine Mischprobe darstellte.

Alle Blutentnahmen erfolgten in tiefer Narkose. Bei den Kaninchen bewährte sich die Injektion von 1-2 ml/kg Thiogenal in die Ohrvene. Um die Narkose bei den Meerschweinchen schneller und kontrollierter durchführen zu können, bauten wir einen durchsichtigen, aus Kunststoff bestehenden Narkosekasten. Dieser bringt folgende Vorteile:

1. Er schützt den Menschen vor unangenehmen Ätherdämpfen.
2. Genauere Dosierung durch ein entsprechendes Äthersprüngerät.
3. Tiere bleiben ruhiger, als dies bei anderen Methoden, wie z.B. Halten der Tiere mit der Hand und davorgehaltenem Ätherglas, der Fall ist.

Die Mäuse kamen vor der Entblutung einige Minuten unter eine Ätherglocke.

3,1.5 Impfschema

Kaninchen und Meerschweinchen wurden zweimal mit den Vaccinen I-VI und die Mäuse zweimal mit den Vaccinen I-IV geimpft. Die Revaccination erfolgte 6 Wochen nach der 1. Impfung.

Für die Blutentnahmen galt folgender Zeitplan:

1. Blutentnahme: 2 Wochen nach der 1. Impfung,
2. Blutentnahme: 4 Wochen nach der 1. Impfung,
3. Blutentnahme: 5 Wochen nach der 1. Impfung,
4. Blutentnahme: 6 Wochen nach der 1. Impfung,
5. Blutentnahme: 8 Wochen nach der 1. Impfung,
bzw. 2 Wochen nach der 2. Impfung,
6. Blutentnahme: 10 Wochen nach der 1. Impfung,
bzw. 4 Wochen nach der 2. Impfung.

Das gewonnene Blut wurde niedertourig zentrifugiert und das Serum bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3,1.6 Antigen und Antigenherstellung

Als Antigen für die Hämagglutinationshemmungs-Reaktion benutzten wir die Influenzavirusstämme A-equi 1 und A-equi 2. Hierzu vermehrten wir sie im 10 Tage bebrüteten Hühnerembryo nach Beimpfung der Allantoishöhle. Bei Stamm A-equi 1, Prag 56 handelte es sich um die 70. und bei Stamm A-equi 2, Miami 63 um die 168. Eipassage. Als Virusernte und Antigenmaterial diente die 4 Tage p.i. gewonnene Allantoisflüssigkeit.

Bei A-equi 1 hatte sie einen HA-Titer von 1:128 und bei A-equi 2 von 1:512. Der entsprechende Infektiositätstiter lag bei Ei D₅₀ $10^{6,75}$ /1 ml.

Für sämtliche Untersuchungen ist das gleiche Antigen verwendet worden.

3,1.7 Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest wurde in 2er Potenzen (0,3 ml) angesetzt und als Verdünnungsflüssigkeit 0,85 % NaCl-Lösung benutzt. Die Hühnererythrozyten-Suspension war 0,5 %. Die Reaktionsdaten waren: Zimmertemperatur, 30 Minuten Inkubationszeit.

Als positive Reaktionen wurden nur solche gewertet, bei denen eine totale Agglutination im Sinne einer +++ Reaktion vorlag.

3,1.8 Hämagglutinationshemmungstest

Für den HAH-Test wurden die zu untersuchenden Seren 30 Minuten bei 56°C inaktiviert und vor Versuchsbeginn mit einer 10 % Hühnererythrozyten-Suspension (gleiche Erythrozyten wie im Test) über 60 Minuten bei 37°C absorbiert. Es schloß sich eine niedertourige Zentrifugation an.

Die Serumverdünnungen erfolgten in 2er Potenzen. Als Verdünnungsflüssigkeit diente physiologische Kochsalzlösung (pH: 7,2). Die Reaktionsdaten des HAH-Testes waren: 30 Minu-

ten Inkubation bei Zimmertemperatur, 0,5 % Hühnererythrozyten-Suspension.

Als Arbeits-Antigendosis wurden einheitlich 4 hämagglutinierende Einheiten benützt.

Als positive Hemmung galten nur die Reaktionen, bei denen das in der Kuppe der Röhrchen knopfförmig angeordnete Blutkörperchensediment zungenförmig auslief.

3,2 V e r s u c h e u n d E r g e b n i s s e

3,2.1 Antikörperbildung in Kaninchen, Meerschweinchen und Maus nach Verimpfung der einzelnen Impfstoffe

3,2.1.1 Allgemeine Beobachtungen

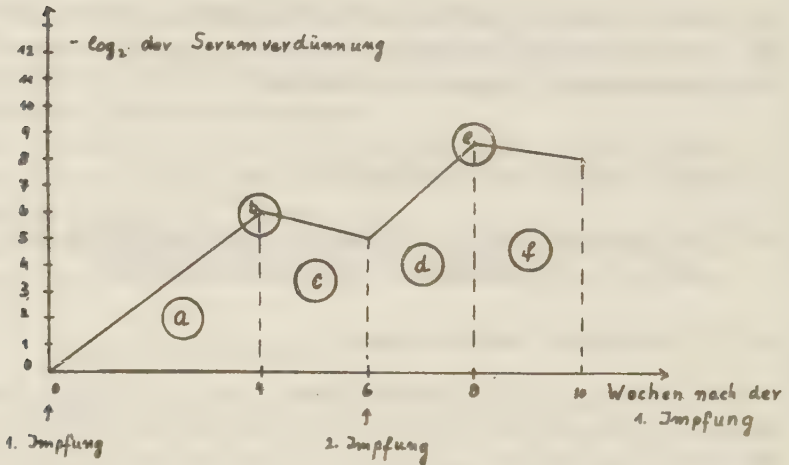
In sämtlichen drei Wirtssystemen kam es auf die Impfung hin zu einer nachweisbaren Antikörperbildung. Bezüglich Quantität und zeitlichem Ablauf variierten die Systeme sowohl als Ganzes, wie auch innerhalb der Impfstoffarten. Trotz dieser Unterschiede ließen sich in den einzelnen Testsystemen folgende Gemeinsamkeiten beobachten.

1. Die Antikörperbildung gegenüber A-equi 1 verlief stets besser als gegenüber A-equi 2, unabhängig vom Wirtssystem.
2. Der Trend der Antikörperbildung war in allen Testsystemen und bei allen Impfstoffen durch folgende Merkmale einheitlich charakterisiert:
 - a) In den Wochen 0-4 nach der ersten Impfung: Starkes Ansteigen der Titer.
 - b) In der 4. Woche: 1. Titermaximum.
 - c) 4. - 6. Woche: leichtes Abfallen der Antikörperwerte.
 - d) Nach der in der 6. Woche durchgeführten, zweiten Impfung: deutlicher Boostereffekt. Dieser trat um so stärker in Erscheinung, je niedriger die Titer in der ersten Impfperiode lagen.

e) In der 8. Woche: 2. Titermaximum.

f) 8. - 10. Woche: Abfall der Titer.

Dieser Trend läßt sich, wie folgt, grob schematisch darstellen:



3. Die Wirksamkeit der Impfstoffe, bezüglich Stimulierung der Antikörperbildung in ihrer Gesamttendenz in den drei Tiersystemen, war überraschend einheitlich.

Abweichend von diesem Grundverhalten stehen folgende Beobachtungen:

1. Bei der Maus führten sämtliche Impfstoffe nach der 2. Impfung zu einem Titeranstieg bis zur 10. Woche, so daß der maximale Wert des 2. Titeranstieges nicht erreicht wurde.
2. Beim Meerschweinchen erreichten die Titer gegen A-equi 1 der Vaccinen III, V und VI schon in der 2. Woche ihr erstes Maximum.
3. Beim Meerschweinchen stiegen die Titer gegen A-equi 2 der Vaccinen I, III und VI bis zur 6. Woche an.

4. Zu einem verzögerten Auftreten der Antikörper gegen A-equi 2 kam es beim Meerschweinchen bei den Vaccinen III und VI und bei der Maus bei den Vaccinen II und III.

3,2.1.2 Einzelergebnisse

3,2.1.2.1 Beim Kaninchen

1. Antikörperbildung gegen A-equi 1 (Tab. 3/Abb. 2)

Die Titerwerte gegenüber A-equi 1 bewegten sich im Rahmen des allgemeinen Kurventrends bei den Vaccinen II-VI etwa auf gleicher Höhe, lediglich die Vaccine I unterschied sich quantitativ hiervon. Die erreichten Titerwerte lagen von Anfang an signifikant über denen der anderen Impfstoffe.

Im einzelnen ergaben sich folgende Kurvenverläufe:

Vaccine I:

Steiler Antikörperanstieg bis zur 4. Woche - 1. Titermaximum bei 7,6 - gleichbleibender Titer bis zur 6. Woche - deutlicher Boostereffekt - 2. Titermaximum bei 10 - beginnender Titerabfall bis zur 10. Woche.

Vaccinen II - VI:

Der Anstieg der Serumantikörper ist weniger steil als bei Vaccine I - 1. Titermaximum: zwischen 3 und 4,6 - geringerer Titerabfall bis zur 6. Woche - deutlicher Boostereffekt - 2. Titermaximum: zwischen 4,8 und 6,4 - Abfall der Titer.

2. Antikörperbildung gegen A-equi 2 (Tab. 3/Abb. 3)

Die stärkere Stimulierung der Antikörperbildung durch Impfstoff I blieb auch gegenüber A-equi 2 erhalten. Im Gegensatz zu den Werten gegenüber A-equi 1, streuten die Vaccinen II-VI in ihrer Antikörperbildung dagegen sehr stark.

Die einzelnen Verlaufsformen lassen sich wie folgt charakterisieren:

Besonders starke Unterschiede bestanden zwischen den Impfstoffen I und III.

Vaccine I:

Steiles Ansteigen bis zur 5. Woche - 1. Titermaximum (5. Woche) bei 5,4 - gleichbleibender Antikörperverlauf bis zur 6. Woche - deutlicher Boostereffekt - 2. Titermaximum bei 8,8 - schwacher Titerabfall bis zur 10. Woche.

Vaccine III:

Zunächst flacher Anstieg bis zur 4. Woche - 1. Titermaximum bei 2,2 - starker Titerabfall bis zur 5. Woche auf 0,8 - besonders starker Boostereffekt - 2. Titermaximum bei 5,6 - leichter Titerabfall.

Mehr einheitlich verhielten sich die Vaccinen II, IV, V, VI:

1. Titermaximum: zwischen 3 und 4 - Abfall der Titer bis zur 5. Woche - starker Boostereffekt - 2. Titermaximum zwischen 4,4 und 7 - besonders starker Titerabfall bei Vaccine IV.

3,2.1.2.2 Beim Meerschweinchen

1. Antikörperbildung gegen A-equi 1 (Tab. 4/Abb. 4)

Die Stimulierung der Antikörperbildung im Meerschweinchen war bei allen geprüften Impfstoffen gegenüber A-equi 1 relativ einheitlich und gut. Im oberen Bereich lag der Impfstoff I, im unteren der Impfstoff III.

Im einzelnen ergibt sich für die jeweiligen Vaccinen folgendes Verhalten:

Vaccine I:

Steiles Ansteigen der Titerkurve bis zur 4. Woche - 1. Titermaximum bei 7,6 - leichter Titerabfall bis zur 6. Woche - relativ schwacher Boostereffekt - 2. Titermaximum bei 10 - der folgende Titerabfall ist sehr gering.

Vaccine III:

1. Titermaximum in der 2. Woche nach der 1. Impfung bei 4,5 - schwacher Titerabfall bis zur 6. Woche - besonders stark ausgeprägter Boostereffekt - 2. Titermaximum bei 8,6 - deutlicher Titerabfall.

Vaccinen II, IV, V, VI; Vaccinen V und VI:

1. Titermaximum in der 2. Woche, bei 6,1 und 6,4;

Vaccinen II und IV:

1. Titermaximum in der 4. Woche bei 5,9 und 5,3 - gleichmäßig schwacher Abfall sämtlicher Titer bis zur 6. Woche - starker Boostereffekt - 2. Titermaximum der vier Vaccinen zwischen 7,9 und 9,7 - relativ steiler Abfall sämtlicher Titer.

2. Antikörperbildung gegen A-equi 2 (Tab. 4/Abb. 5)

Die Antikörperbildung gegen A-equi 2 unterschied sich sehr stark von der gegenüber A-equi 1. Die Vaccinen III, V und VI führten nach der 1. Impfung zu einer kaum nachweisbaren Antikörperbildung. Erst auf die Boosterimpfung hin kam es zu einem deutlichen Antikörperanstieg. Im Gegensatz hierzu stimulierten die Vaccinen I, II und IV die Antikörperbildung von Anfang an. Der Antikörperanstieg war aber langsam und lag unter dem gegenüber A-equi 1.

Auch bei diesen Vaccinen kam es zu einem deutlichen Boostereffekt auf die Revaccination hin. Die erreichten Höchstwerte lagen aber auch hier niedriger als gegenüber A-equi 1.

Im einzelnen zeigen die Vaccinen III, V und VI folgende Verlaufsformen:

Bei Vaccine III kommt es erst ab der 2. Woche, bei Vaccine VI erst ab der 4. Woche zum Erscheinen von Serumantikörpern. Die Titer beider Impfstoffe steigen dann bis zur 6. Woche auf einen Titerwert von 0,9 und 1,3 an. Vaccine V erreicht ihr 1. Titermaximum schon in der 2. Woche bei der Verdünnungsstufe 0,6 und verbleibt so bis zur 6. Woche. - Der Boostereffekt ist bei allen Vaccinen dieser Gruppe ganz besonders gut ausgebildet - das 2. Titermaximum liegt für

die Vaccinen III und V bei 6,6 und 6, für Vaccine VI bei 4,3 - relativ starker Titerabfall bis zur 10. Woche.

Die Vaccinen I, II und IV verhalten sich dem gegenüber wie folgt:

1. Titermaximum der Vaccine I in der 6. Woche bei 5,9, der Vaccinen II und IV in der 4. Woche bei 4,2 und 4. - Abfall der Antikörperwerte der Vaccinen II und IV bis zur 6. Woche - Boostereffekt bei Vaccine I schwach, wesentlich deutlicher bei den Vaccinen II und IV - 2. Titermaximum zwischen 6,8 und 7,8 - schwacher Titerabfall bei Vaccine I, starker Abfall bei Vaccine IV.

3.2.1.2.3 Bei der Maus

1. Antikörperbildung gegen A-equ 1 (Tab. 5/Abb. 6)

Gegenüber A-equ 1 stimulierten die getesteten Vaccinen in der Maus eine gute Antikörperbildung. Sowohl im Trend als auch in der Quantität unterschieden sich dabei die Vaccinen wenig. Die Vaccine I lag wieder im oberen Bereich, die Vaccine IV grenzte die Verlaufsformen nach unten ab. Gegenüber den Impfungen im Kaninchen und im Meerschweinchen verlief die Boosterreaktion in der Maus anders. Nach der Revaccination stiegen die Antikörperwerte nicht so steil wie in den anderen Testsystemen an. Sie erhöhten sich langsam, dafür aber kontinuierlich. Der ansteigende Trend hielt bis zum Versuchsende (10. Woche) an. In diesem Verhalten glichen sich alle getesteten Vaccinen.

Für die einzelnen Vaccinen ergaben sich dabei folgende Werte:

Steiles Ansteigen sämtlicher Titer bis zur 4. Woche -

1. Titermaximum zwischen 6 und 8 - leichter Titerabfall - Boostereffekt sehr schwach - Ansteigen sämtlicher Titer bis zur 10. Woche, wobei die Titer der Vaccinen I und II die Verdünnungsstufen 10 und 9,5 erreichen. Die Titerkurven der Vaccinen III und IV treffen sich in der 10. Woche auf der Verdünnungsstufe 7.

2. Antikörperbildung gegen A-equi 2 (Tab. 5/Abb. 7)

Auffällig war wieder die schlechte Antikörperstimulierung gegenüber A-equi 2 nach der 1. Impfung. Auf die Revaccination hin stiegen die Antikörpertiter zwar an, zeigten ansonsten aber ein ähnliches Verhalten wie gegenüber A-equi 1 nach der Boosterimpfung. Der Anstieg war langsam, hielt aber wie gegenüber A-equi 1 bis Versuchsende (10. Woche) an.

Dabei wurden folgende Werte gemessen:

Vaccine I:

1. Titermaximum in der 2. Woche bei 2 - gleichbleibender Titerwert bis zur 6. Woche - deutlicher Boostereffekt - steiles Anwachsen der Serumantikörper zwischen 8. und 10. Woche (Endtiter 8).

Vaccine II:

Erscheinen der Serumantikörper erst ab der 4. Woche -

1. Titermaximum in der 5. Woche bei 1 - Gleichbleiben des Titers bis zur 6. Woche - starker Boostereffekt -

2. Titermaximum bei 4,0 - gleichbleibender Titer bis zur 10. Woche.

Vaccine III:

Die Antikörper erscheinen erst nach der 2. Impfung - ab der 6. Woche starkes Anwachsen der Serumantikörper bis zur letzten Blutentnahme in der 10. Woche - erreichter Titerwert: 5,0.

Vaccine IV:

1. Titermaximum in der 4. Woche bei 2 - gleichbleibender Titerwert bis zur 6. Woche - relativ schwacher Boostereffekt - Ansteigen des Titers bis zur 10. Woche (Endtiter 4,5).

3,2.2 Verträglichkeit der getesteten Impfstoffe in den einzelnen Tiersystemen

Die Verträglichkeit der einzelnen Impfstoffe in den drei Wirtssystemen, Kaninchen, Meerschweinchen und Maus, war sehr unterschiedlich, auch wenn man die unterschiedliche

Impfmenge pro Tiergröße dabei berücksichtigt. Im Kaninchen wurden keine Impfreaktionen beobachtet. Im Meerschweinchen führten einige Vaccinen und in der Maus praktisch alle getesteten Vaccinen, mit Ausnahmen der Spaltvaccinen, zu postvaccinalen Lokalreaktionen. Am verträglichsten für alle drei Wirtssysteme erwies sich die Spaltvaccine. Postvaccinale Reaktionen wurden bei ihr in keinem Wirtssystem beobachtet.

Qualitativ handelte es sich bei den postvaccinalen Reaktionen durchwegs um Lokalreaktionen an der Impfstelle, die durch Schwellung mit Schmerz, teilweise auch nekrotische Einschmelzung des um die Impfstelle gelegenen Gewebes charakterisiert waren. Bei der Maus entwickelten sich sterile Abszesse, die sicher auch durch die relativ hohe Impfdosis von 1,0 ml gegenüber den anderen Testsystemen, mit verursacht wurden. Störungen des Allgemeinbefindens, wie z.B. Fraßunlust, und sonstige Impfkomplicationen traten nicht auf. Die vereinzelt Todesfälle müssen als interkurrent und unspezifisch gewertet werden.

Im einzelnen verhielten sich die Impfstoffe wie folgt:

a) Kaninchen

Alle Impfstoffe erwiesen sich im Kaninchen als gut verträglich.

b) im Meerschweinchen

Drei der mit Vaccine III geimpften - und vier der mit Vaccine IV geimpften Meerschweinchen zeigten 8 Tage nach der 1. Impfung markstückgroße Nekrosen in Umgebung der Impfstelle.

c) in der Maus

An der Maus konnte man die meisten Impfreaktionen beobachten, die je nach Impfstoff in ihrer Häufigkeit und Art stark variierten:

Vaccine I:

keinerlei Impfreaktionen,

Vaccine II:

bei 51 der 60 geimpften Mäuse entstand ein kirschkerngroßer Abszess in Umgebung der Injektionsstelle,

Vaccine III:

bei 35 der 60 geimpften Tiere kam es zu flächenartigen Verdickungen an der Impfstelle. Folgende Todesfälle konnten registriert werden: 1 Maus starb zehn Tage und 3 Mäuse starben fünf Wochen nach der 1. Impfung.

Vaccine IV:

Bei 17 der 60 mit Vaccine IV geimpften Tiere, wurden flächenartige Verhärtungen in Umgebung der Impfstelle beobachtet.

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

4,1 K r i t i s c h e B e t r a c h t u n g e n z u r M e s s m e t h o d e

Jede Prüfung von Impfstoffen außerhalb des natürlichen Impflings ist problematisch. Trotzdem wird man aus technischen Gründen niemals auf Prüfungen im kleinen Versuchstier verzichten können. Der Aussagewert derartiger Prüfungen ist aber stets relativ. Bei Analogieschlüssen zum natürlichen Impfling muß dies berücksichtigt werden.

Im vorliegenden Fall wurden die Impfstoffe lediglich, sieht man von der Verträglichkeitsprüfung ab, auf die Fähigkeit hin überprüft, hämagglutinationshemmende Antikörper gegenüber den in der Vaccine hauptsächlich enthaltenen Antigenen A-equi 1 und A-equi 2 zu stimulieren. Der Grad der Stimulierung ist dabei abhängig vom verwendeten Wirtssystem und von der in der Vaccine enthaltenen jeweiligen antigenen Aktivität. Sie wird sich zwar in den einzelnen Wirtssystemen unterschiedlich auswirken, im allgemeinen aber doch einen gewissen einheitlichen Trend bezüglich keiner, geringer oder starker Antikörperstimulierung zeigen. Insofern sind gerade bei der vergleichenden Betrachtung der Antikörperbildung Analogieschlüsse erlaubt und werden nicht zu viele Fehlerquellen enthalten.

Zur Antikörper-Meßmethode im einzelnen ist noch folgendes zu sagen:

Für den hier angewandten HAH-Test wurde eine Serumverdünnungsreihe 2. Grades hergestellt. Dies bedeutet eine schrittweise Halbierung der Antikörperkonzentration, wobei Konzentrationen, welche zwischen zwei Verdünnungsstufen liegen, nicht erfaßt werden. Also sind alle Meßpunkte nur auf eine Verdünnungsstufe nach oben genau. Wurde zum Beispiel die letzte Reaktion nach 5-maliger Verdünnung festgestellt, so können noch Reaktionen zwischen der 5. und 6. Verdünnungsstufe stattfinden. Daher gilt, beim Vergleich mehrerer

Serumproben eines Tieres im HAH-Test, als signifikanter Titeranstieg bzw. -abfall nur eine Erhöhung oder Erniedrigung der Titer um zwei oder mehr Einheiten (= Halbierungen der Antikörperkonzentration).

Um einen schnelleren Überblick über die Antikörperbildung der Impfstoffe bei den einzelnen Tierarten zu bekommen, wurden die Meßpunkte durch Geraden verbunden. Dies entspricht aber sicher nicht dem natürlichen Verlauf der Antikörperbildung, da die so entstehenden Kurven an den Meßpunkten Knicke bekommen, und auch der exponentielle Abfall der Kurven nach den Maxima nicht berücksichtigt wird. Welche Klassen von Kurven den tatsächlichen Verlauf der Antikörperbildung am besten repräsentieren würden, ist unbekannt.

Bei den Mäusen wurden, um die Schwierigkeit einer Herzpunktion zu umgehen, für jeden Test, 2 x 5 Mäuse entblutet, wobei das Blut von 5 Mäusen jeweils eine Blutprobe ergab. So wurden also für jede Blutentnahme neue Mäuse verwendet, während bei Kaninchen und Meerschweinchen stets die gleichen getestet wurden. Inwieweit man daher die Ergebnisse der Mäuse mit jenen von Meerschweinchen und Kaninchen vergleichen kann, ist fraglich.

4,2 Vergleichende Auswertung der Wirksamkeit der getesteten Impfstoffe

Bezüglich Wirksamkeit der Impfstoffe fiel auf, daß alle getesteten Impfstoffe zu einer Antikörperstimulierung führten. Der Trend im Verlauf der Antikörperbildung nach der 1. und 2. Impfung war dabei ebenfalls relativ einheitlich: Das 1. Titermaximum lag in der 4. Woche nach der 1. Impfung, das 2. Titermaximum in der 2. Woche nach der Revaccination (= 8. Woche nach der 1. Impfung). Alle Impfstoffe bewirkten einen deutlichen Boostereffekt und einen langsamen Titer-

abfall nach dem 2. Maximum. Auch die Titerwerte lagen im großen und ganzen, bis auf wenige Ausnahmen (Vacc. I beim Kaninchen), relativ nahe beieinander, wobei ein teilweises Überkreuzen und Ineinanderlaufen der Kurven zu beobachten war.

Die gemeinsamen Reaktionsverläufe weisen darauf hin, daß in allen Vaccinen wirksame Antigene enthalten waren und daß sich diese Antigene in ihrer Aktivität in etwa gleichen. Die beobachteten unterschiedlichen Verlaufsformen in der Antikörperbildung, vor allen Dingen bezüglich erreichten Antikörperwerten, lassen sich im wesentlichen auf folgenden Faktoren zurückführen:

1. Unterschiedliche Aktivität der Antigene in den einzelnen Wirtssystemen.
2. Relation: Impfdosis - Körpergewicht.
3. Unterschiedliche Menge an Einzelantigenen.
4. Unterschiedliche Inaktivierung bzw. Spaltung.
5. Unterschiedlicher Zusatz an Adsorbentien.
6. Unterschiedlicher Zusatz an Adjuvantien.

Klassifiziert man die Impfstoffe grob in Spalt- und Ganzvaccinen, so ergibt sich folgendes Bild:

Innerhalb der Gruppe der Ganzvaccinen fiel kein Impfstoff besonders positiv bzw. negativ auf. Die Impfstoffe dieser Gruppe zeigten keine erheblichen signifikanten Unterschiede bezüglich Antikörperbildung, da sich die Kurven der fünf zur Diskussion stehenden Impfstoffe in den Meßpunkten nur um maximal zwei Verdünnungsstufen unterschieden und dies in unregelmäßiger Weise geschah (Abb. 2-7). Wohl lagen die Titer der Vaccine III in der 1. Impfperiode stets unterhalb der Antikörperwerte der übrigen Ganzvaccinen, zeigten jedoch einen sehr guten Boostereffekt, so daß das 2. Titermaximum mit dem der übrigen Ganzvaccinen übereinstimmte.

Der Spaltimpfstoff unterschied sich bezüglich Antikörperbildung quantitativ stark von den Ganzimpfstoffen. Der

Kurvenverlauf nach der Impfung mit der Spaltvaccine lag praktisch in jedem Wirtssystem höher als nach der Impfung mit Ganzvaccinen. Die Meßwerte unterschieden sich spätestens ab der 4. Woche (mit Ausnahme bei der Maus) um mehr als 2 Verdünnungsstufen von den durchschnittlichen Werten der Ganzimpfstoffe. Am deutlichsten war dieses Verhalten beim Kaninchen, wobei die maximalen Werte der Antikörpertiter gegen A-equi 1 von denen der Ganzimpfstoffe 3-3 1/2 Verdünnungsstufen auseinander lagen. In der 6. Woche (Minimum der 1. Impfperiode) lag die obere Begrenzung der Ganzvaccinen vom Spaltimpfstoff (Vaccine I) 4 Verdünnungsstufen entfernt.

Die Gründe für das wesentlich bessere Abschneiden des Spaltimpfstoffes in allen drei Tiersystemen sind nicht bekannt. Sie können im Spaltprozeß selbst liegen, ebenso gut können dafür aber auch die jeweiligen Adjuvantien bzw. Adsorbentien verantwortlich sein.

Interessant erscheint ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren. Maess et al. (19) fanden bei einem Vergleich eines polyvalenten Spaltimpfstoffes (hergestellt mit Tween-Äther unter Zusatz von inkomplettem Freund'schen Adjuvans) mit kommerziellen Vaccinen in der Maus eine Überlegenheit des Spaltimpfstoffes bezüglich Quantität und Geschwindigkeit der Bildung von Serumantikörpern. Da hier neben dem Wirtssystem der Faktor "Adjuvans" ebenfalls mitspielt, ist eine Entscheidung zugunsten des Spaltsystems ebenfalls nicht möglich. Nach Bryans et al. (9) stimuliert inkomplettes Freund'sches Adjuvans sehr stark die Antikörperbildung und führt zu einer Verlängerung der Antikörperpersistenz. Nach Maess et al. (19), die Spalt-Antigene enthaltende Monoversuchsvaccinen mit kommerziellen Impfstoffen auch beim Pferd vergleichen, erzeugen erstere in geringem Umfang auch Antikörper gegen den heterologen Virusstamm. Die gute antigene Wirkung menschlicher Influenza-Spaltvaccinen wird von Webster und Laver (45) hervorgehoben, nachdem sie diese Impfstoffe am Kaninchen testeten.

4,3 Verträglichkeit der Impfstoffe

Bezüglich Verträglichkeit der Impfstoffe in den einzelnen Wirtssystemen, bestanden Unterschiede hauptsächlich zwischen dem Spaltimpfstoff und den Ganzimpfstoffen. Der Spaltimpfstoff (Vaccine I) führte in keinem der 3 Wirtssysteme zu irgendwelchen Impfreaktionen. Nach Verimpfung der Ganzvaccinen kam es dagegen mit Ausnahme der Vaccinen V und VI, die an Mäusen nicht getestet wurden, zu nekrotischen Veränderungen in den Meerschweinchen und zu Abszessbildungen bei den Mäusen.

Die Überlegenheit der Spaltimpfstoffe bezüglich Verträglichkeit gegenüber den Ganzimpfstoffen wird in der Literatur vielfach bestätigt (45). Bei den Spaltvaccinen werden durch die Ätherbehandlung wirtsspezifisches Eiweiß und lipoidhaltige Komponenten aus dem Viruspartikel herausgelöst, was zu einem Verlust der Pyrogenität und Toxizität führt.

4,4 Vergleichende Auswertung der 3 Wirtssysteme bezüglich ihrer Eignung zur Wirksamkeitsprüfung von Pferdeinfluenza-Impfstoffen

Die Prüfung von Pferdeinfluenza-Vaccinen im kleinen Versuchstier ist notwendig. Bei der Frage, welche Versuchstiere sich hierfür am besten eignen, sind folgende Gesichtspunkte besonders zu berücksichtigen.

1. In welchen Versuchstieren ist die Antikörperbildung nach Erstimpfung und Revaccination zeitlich und quantitativ am besten?
2. In welchen Versuchstieren kommen antigene Unterschiede der Vaccinen bezüglich Bildung von hämagglutinationshemmenden Antikörpern am besten heraus?

3. In welchen Versuchstieren gleicht die Antikörperbildung nach Verimpfung von Pferdeinfluenza-Vaccinen am ehesten der beim Pferd?
4. Bei welchen Versuchstieren kann genau (Einzelblutprobe) und ohne großen Aufwand gearbeitet werden?
5. Bei welchen Versuchstieren kann die größte Zahl an gleichen Reagenten eingesetzt werden?

Bezüglich Punkt 1 zeigten Kaninchen und Meerschweinchen sowohl nach der Erstimpfung, als auch nach der Revaccination einen relativ raschen Antikörperanstieg. Die erreichten Titerwerte lagen beim Kaninchen zwar etwas über denen vom Meerschweinchen, jedoch war der Unterschied sehr gering. Beim Kaninchen wurden nach der Erstimpfung Höchstwerte um 7,6 gegen A-equi 1 und 5,4 gegen A-equi 2 erreicht. Abweichend hiervon verhielt sich die Maus. Die Antikörperentwicklung war verzögert und quantitativ geringer als bei Kaninchen und Meerschweinchen. Dies betrifft aber im wesentlichen nur die Reaktion der Maus gegenüber der A-equi 2 Komponente der Impfstoffe. Gegenüber A-equi 1 war die Antikörperbildung gut. Der Boostereffekt trat jedoch verzögert und nicht so deutlich wie bei Meerschweinchen und Kaninchen auf.

Bezüglich antigenen Unterschiede der einzelnen Vaccinen reagierten Kaninchen und Meerschweinchen wieder am besten. Auch hier dürfte das Kaninchen dem Meerschweinchen geringgradig überlegen sein, besonders wenn man die unterschiedliche Antikörperbildung nach Verimpfung von Spalt- und Ganzvaccinen vergleicht. Bei den Mäusen kamen diese Unterschiede nicht so deutlich heraus.

Über die Antikörperbildung beim Pferd nach Schutzimpfung mit Pferdeinfluenza-Vaccinen liegen Untersuchungsergebnisse, vor allem von Ackermann (1) und Pressler (32) vor. Ackermann

untersuchte die Antikörperbildung nach Impfung mit Vaccine II an 10 Warmblutpferden. Die Serumtiter vor der 1. Impfung gegenüber A-equi 1 lagen bei 1:40, gegenüber A-equi 2 bei $< 1:20$. Nach der Schutzimpfung stiegen die Titer bis zur 3. Woche an und erreichten dabei Antikörperwerte von 1:320 gegen A-equi 1 und 1:80 gegen A-equi 2. Sie hielten sich etwa bis zur 4./5. Woche auf gleicher Höhe, um dann abzusinken. Die Boosterimpfung erfolgte 6 Wochen nach der Erstimpfung. Es kam zu einem deutlichen Titeranstieg, der seine Höchstwerte etwa zwei Wochen nach der Boosterimpfung erreichte. Bis zur 9. Woche hielten sich die Titer dann auf etwa gleicher Höhe.

Vergleicht man obige Werte mit den in den einzelnen Testsystemen erzielten Titern nach der Schutzimpfung mit Vaccine II, so stellt man überraschend fest, daß die Antikörperbildung sowohl im Kaninchen, wie im Meerschweinchen ähnlich verläuft. Bei der Maus traten jedoch gewisse Unterschiede auf. Einmal stiegen die Antikörperwerte gegen A-equi 1 bis zur 10. Woche, ohne das 2. Titermaximum zu erreichen, zum anderen traten die Antikörper gegen A-equi 2 erst ab der 4. Woche in Erscheinung und erreichten in der 5. Woche das 1. Titermaximum. Daher scheint die Maus für eine vergleichbare Messung der Antikörperbildung gegen Pferdeinfluenza-Vaccinen im Vergleich zu Kaninchen und Meerschweinchen nicht sehr geeignet.

Bezüglich Genauigkeit der Testmethoden und geringen Arbeitsaufwand sind Kaninchen und Meerschweinchen ebenfalls den Mäusen überlegen. Bei der Maus können Einzelproben praktisch nicht gezogen werden, wie dies beim Kaninchen und Meerschweinchen möglich ist. Diese Tiere lassen sich mehrmals bluten und man kann deshalb relativ einfach den Verlauf der Antikörperbildung stets beim gleichen Tier verfolgen. Bei der Maus ist dies nicht möglich. Man muß hierfür mit Mischblut arbeiten, das bezüglich einzelnen Probeentnahmen stets

von anderen Tieren stammt. Laufende Blutentnahmen bei der Maus sind zwar möglich, bringen aber so wenig Serum, daß für Routinebedingungen diese Methode ungeeignet scheint.

Bezüglich Kriterium 5 sind Mäuse zweifelsohne den Meerschweinchen und Kaninchen überlegen.

Eine kritische Auswertung obiger Gesichtspunkte führt zu dem Schluß, daß sich Meerschweinchen und Kaninchen für eine Wirksamkeitsprüfung von Pferdeinfluenza-Vaccinen besser eignen. Kaninchen dürften dabei den Meerschweinchen geringgradig überlegen sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Sechs verschiedene Pferdeinfluenza-Impfstoffe (5 Ganz-, 1 Spaltimpfstoff) wurden vergleichend auf ihre Wirksamkeit im Kaninchen, Meerschweinchen und in der Maus untersucht. Als Wirksamkeitskriterium galt die Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper. Der Verlauf der Antikörperbildung wurde in den 3 Wirtssystemen nach einmaliger Impfung und nach Revaccination untersucht. Gleichzeitig wurde die Verträglichkeit der Vaccinen beim Kaninchen, Meerschweinchen und der Maus kontrolliert.

Sämtliche geprüften Vaccinen führten zu einer signifikanten Antikörperbildung. Auf die Revaccination kam es zu einem typischen Boostereffekt.

Die Antikörperbildung in den 3 Wirtssystemen war unterschiedlich. Im Kaninchen und Meerschweinchen stimulierten die Impfstoffe eine schnellere und stärkere Antikörperbildung als in der Maus, bei der besonders die Antikörperbildung gegenüber A-equi 2 abfiel. Auch die antigenen Unterschiede zwischen den einzelnen Vaccinen kamen im Kaninchen und Meerschweinchen deutlicher zum Ausdruck als in der Maus. In beiden Fällen schien das Kaninchen dem Meerschweinchen gegenüber leicht überlegen.

Auf die Revaccination reagierten Kaninchen und Meerschweinchen mit einem relativ raschen Titeranstieg, deren Höchstwerte 2 Wochen nach der Boosterimpfung erreicht waren. Bei der Maus trat die Boosterwirkung verzögert auf, die Titer stiegen kontinuierlich bis Versuchsende in der 10. Woche an.

Die Antikörperbildung nach Schutzimpfung mit Pferdeinfluenza-Vaccinen glich im Kaninchen und Meerschweinchen in etwa der beim Pferd.

In allen 3 Wirtssystemen führte die Spaltvaccine zu einer stärkeren Antikörperbildung als die Ganzvaccine.

Auch bezüglich Verträglichkeit war die Spaltvaccine den Ganzvaccinen überlegen. In keinem Wirtssystem traten nach Verimpfung der Spaltvaccine postvaccinale Reaktionen auf. Bei den Ganzvaccinen kam es in den Meerschweinchen zu lokalen nekrotischen Prozessen und bei den Mäusen zu Impfabzessen.

Für die Wirksamkeitsprüfung von Pferdeinfluenza-Vaccinen eignen sich Meerschweinchen und Kaninchen besser als die Maus. Kaninchen sind dem Meerschweinchen dabei geringgradig überlegen.

5. SUMMARY

Six different equine influenza vaccines (5 full vaccines, 1 disintegrated vaccine) were examined in comparative tests for their efficiency in rabbits, guinea-pigs and mice. The development of inhibiting hemagglutination-antibodies was the criterion for the efficiency. The course of the development of antibodies was examined after the first examination and after revaccination in 3 host systems. The safety of the vaccines in rabbits, guinea-pigs and mice was controlled at the same time.

All examined vaccines effected a significant development of antibodies. The revaccination resulted in a typical booster effect.

The development of antibodies was different in the 3 host systems. In rabbits and guinea-pigs the vaccines stimulated a faster and stronger development of antibodies than in mice, were especially the development in relation to A-equi 2 decreased. Also, the antigenic differences among the vaccines could be seen more distinctly in rabbits and guinea-pigs than in mice. In both cases rabbits were slightly superior to guinea-pigs.

After revaccination, rabbits and guinea-pigs reacted with a relatively rapid increase of the titer. The peak values were reached 2 weeks after the booster vaccination. In mice, the booster effect was retarded, the titers increased continually up to the end of the tests after 10 weeks.

The development of antibodies with equine influenza vaccine in rabbits and guinea-pigs was similar to that in horses.

In all 3 host systems the disintegrated vaccine effected a higher antibody-level than the full vaccines.

As to safety the disintegrated vaccine was better than the full vaccines. In no host system there occurred post-vaccinal reactions after vaccination with the disintegrated vaccine.

After vaccination with full vaccines guinea-pigs showed local necrotic lesions and mice has postvaccinal abscesses.

For the efficiency test of equine influenza vaccines guinea-pigs and rabbits are suited better than mice. Rabbits are slightly superior to guinea-pigs in this case.

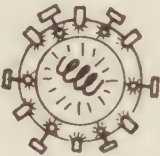
Tab. 1

Wichtigste Eigenschaften des Pferdeinfluenza-Virus

Durchmesser des Virions	80 - 120 nm
Form	kugelförmig
Gewicht	$150 - 310 \times 10^6$
Dichte (Gramm/ml)	1,24
chemische Zusammensetzung	Protein 60-70 %, Lipide 25 % Kohlehydrate 3-15 %, NS 0,7-4 %
Nukleinsäuretyp	Ribonukleinsäure (RNS)
Molekulargewicht der Nukleinsäure	$2 - 5 \times 10^6$
Nukleinsäurestrang	einfach
Kapsidsymmetrie	helikal
Durchmesser der Helix	9 nm
Virushülle	ja
Oberflächenprojektion	Spikes
Oberflächenstruktur von innen und außen	1. Spikes 2. elektronentransparente Schicht 3. fein granuliert Schicht
Antigene	1. ganzes Virion: Infektiositäts Immunitätskomp 2. an der Oberfläche: Hämagglutinin Neuraminidase wirtsspezifische Komponente 3. im Inneren: g- oder RNP-Antigen
Hämagglutinin-Sedimentationskonstante	7, 5 S
Neuraminidase-Sedimentationskonstante	8,5 S
Pyrogene und Toxine	ja, teilweise Beziehung zum Lipidgehalt
Hämagglutination	ja, Erythrozyten von Huhn, Taube, Schwan (7), Meerschweinchen, Pferd, Schaf, Schwein, Kalb, Mensch (Blutgruppe O), Wachtel und Kaninchen
Einschlußkörperchen	nein
Ather- und Chloroformverhalten	labil
Ort der Kapsidbildung	Zytoplasma
Ort der Umhüllung	Oberflächenmembran der Zellwand

Tab. 2

Grobschematischer Vergleich zwischen Pferdeinfluenza-Ganzimpfstoffen und -Spaltimpfstoffen bezüglich Gehalt an viralen Aufbaukomponenten, Eigenschaften und Antikörperbildung.

Merkmale:	infektiöses Viruspartikel- chen	Virusbestandteile und Aktivitäten in	
		Ganzimpfstoffen	Spaltimpfstoffen
Strukturelemente:			
	infektiöses Virion	intaktes Virion	aufgespaltenes Virion
Nucleocapsid	+	+	+
Hämagglutinin	+	+	+
Neuraminidase	+	+	+
Chemische Bestandteile:			
Nukleoprotein	+	+	+
Eiweiß	+	+	-
Lipide	+	+	-
Kohlenhydrate	+	+	+
Eigenschaften:			
Infektiosität	+	-	-
Toxizität	+	+	-
Pyrogenität	+	+	-
Hämolyse	+	+	-
Complementbindende Akti- tät	+	+	+
Hämagglutination	+	+	+
Immunisierende Aktivität	+	+	+
Antikörperbildung:			
Neutralisierende	+	+	+
Hämagglutinations- hemmende	+	+	+
Complementbindende	+	+	+

Verlauf der Bildung von HAH-Antikörpern gegen A-equi 1 und A-equi 2 nach einmaliger und zweimaliger Impfung von Kaninchen mit verschiedenen hergestellten Pferdeinfluenza-Impfstoffen.
(2. Impfung erfolgte im Abstand von 6 Wochen nach der 1. Impfung. Die angegebenen Titer stellen die Mittelwerte aus 5 Kaninchen dar).

Antikörper- titer gegen	Zeitpunkt der Testung in Wochen nach d. 1. Impfung	Vaccine					
		I	II	III	IV	V	VI
A-equi 1	2.	5	3	1,6	2	2,8	3
	4.	7,6	4,6	3	3,4	3,8	3,8
	5.	7,6	3,6	2,6	3,2	3,6	3,6
	6.	7,6	3,2	2,6	3,2	3,4	3,6
	8.	10	6,4	5,8	5,6	4,8	5,8
	10.	9	6	5,6	4,2	4	4,8
A-equi 2	2.	2,8	1,8	0,6	1,4	2,6	2,2
	4.	5	3,2	2,2	3	4	3,4
	5.	5,4	2,4	0,8	2,4	2,8	1,6
	6.	5,4	1,8	0,8	2,4	2,8	1,4
	8.	8,8	6,4	5,6	7	4,4	4,8
	10.	8,4	5	5,2	4,2	4,8	4,6

Verlauf der Bildung von HAH-Antikörpern gegen A-equi 1 und A-equi 2 nach einmaliger und zweimaliger Impfung von Meerschweinchen mit verschieden hergestellten Pferdeinfluenza-Impfstoffen.

(2. Impfung erfolgte im Abstand von 6 Wochen nach der 1. Impfung. Die angegebenen Titer stellen die Mittelwerte aus 10 Meerschweinchen dar.)

Antikörper-Titer gegen	Zeitpunkt der Testung in Wochen nach der 1. Impfung	Vaccine I	Vaccine II	Vaccine III	Vaccine IV	Vaccine V	Vaccine VI
A-equi 1	2.	6,4	5,3	4,5	3,1	6,4	6,1
	4.	7,6	5,9	4	5,3	5,8	5
	5.	7,2	5,6	3,6	5,3	5	4,6
	6.	7,2	5,3	3,2	5	4,9	4,3
	8.	10	8,8	8,6	7,9	9,3	9,1
	10.	9,7	7,4	7,1	6,2	8	1,1
A-equi 2	2.	1,9	1,9	0	2,5	0,6	0
	4.	3,5	4,2	0,4	4	0,6	0
	5.	3,8	4	0,8	3,7	0,6	0,2
	6.	5,9	3,9	0,9	3,5	0,6	1,3
	8.	7,8	7,5	6,6	6,8	6	4,3
	10.	7,5	6,3	5,4	4,4	3,2	2,8

Verlauf der Bildung von HAH-Antikörpern gegen A-equi 1 und A-equi 2 nach einmaliger und zweimaliger Impfung von Mäusen mit verschieden hergestellten Pferdeinfluenza-Impfstoffen. (2. Impfung erfolgte im Abstand von 6 Wochen nach der 1. Impfung. Die angegebenen Titer stellen die Mittelwerte von 2 Mäusegruppen à 5 Mäusen dar.)

Antikörper-Titer gegen	Zeitpunkt der Testung in Wochen nach d. 1. Impfung	Vaccine I	Vaccine II	Vaccine III	Vaccine IV
A-equi 1	2.	5,5	5	4	4
	4.	8	7,5	7	6
	5.	7,5	6,5	6,5	5,5
	6.	7,5	6,5	6	5,5
	8.	9	8	6,5	6
	10.	10	9,5	7	7
A-equi	2.	2	0	0	1
	4.	2	0	0	2
	5.	2	1	0	2
	6.	2	1	0	2
	8.	4	4	2	3
	10.	8	4	5	4,5

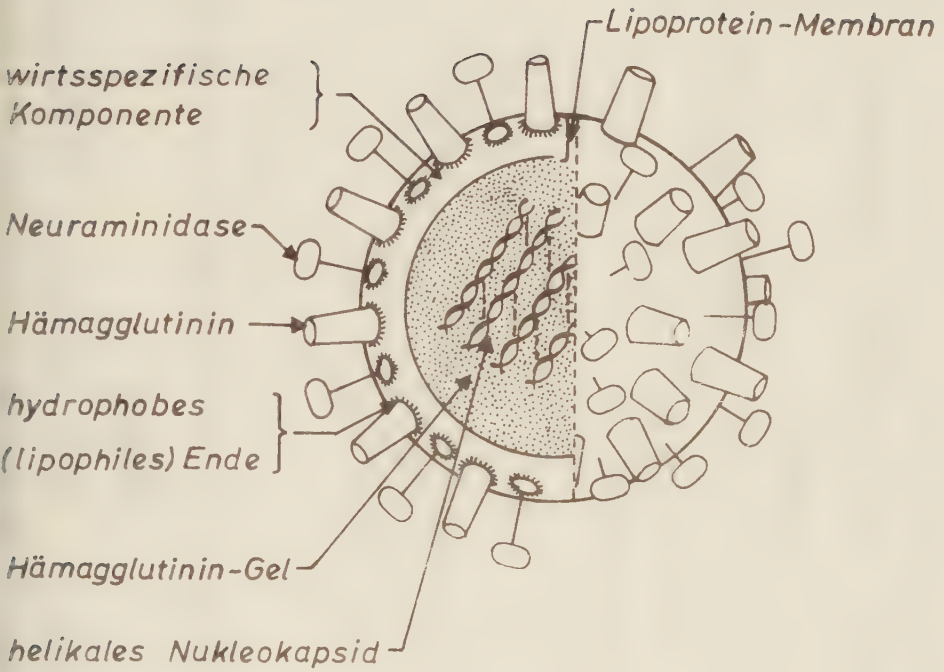


Abb. 1: Grobschematischer Aufbau des Pferdeinfluenzavirus

$-\log_2$ der Serumverdünnung

Vaccine I: —
 Vaccine II: - - -
 Vaccine III: - · - · -
 Vaccine IV: · · · · ·

1 60 1

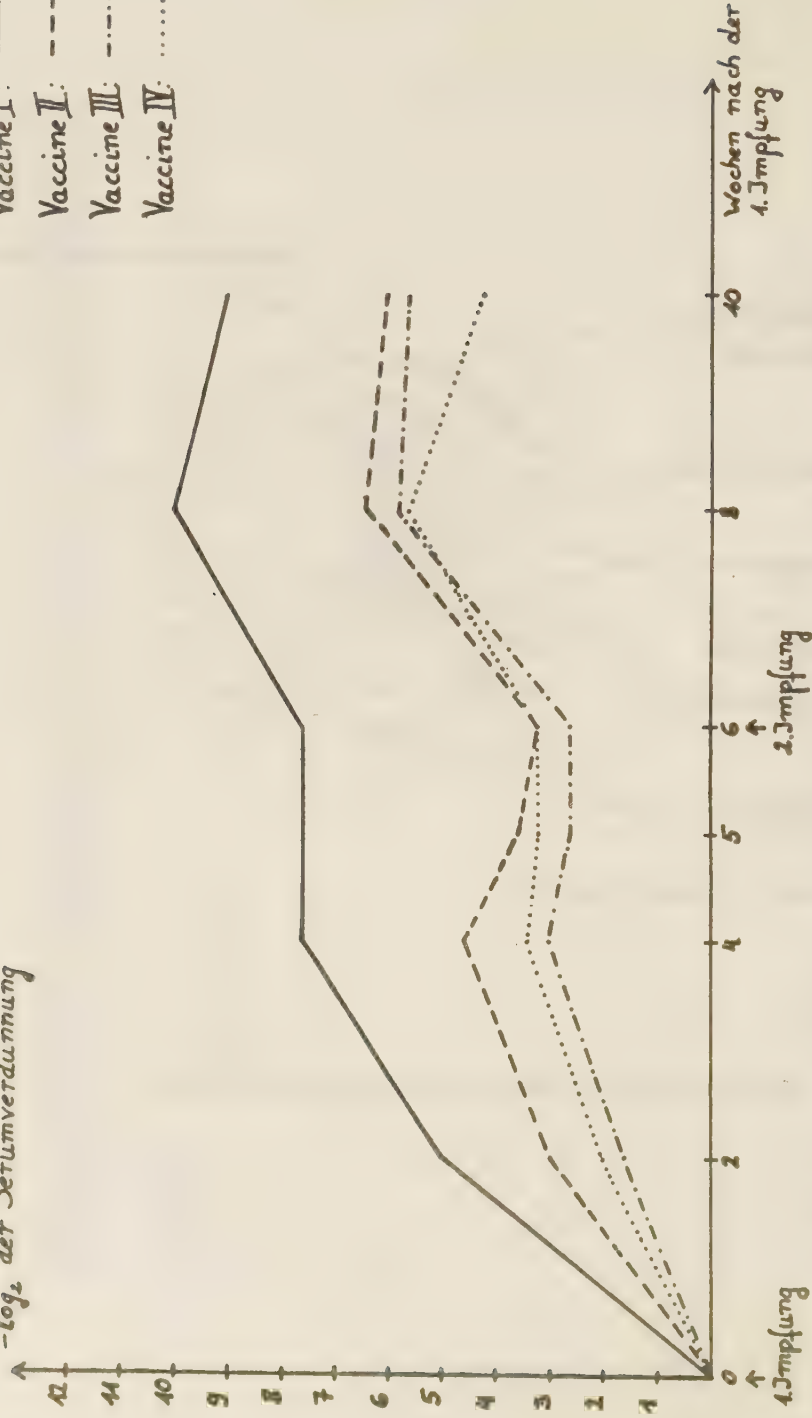


Abb. 2: Verlauf der Antikörperbildung (HAH - Antikörper, Mittelwerte) im Kaninchen gegenüber A-entz.

$-\log_2$ der Serumverdünnung

Vaccine I: —
 Vaccine II: - - -
 Vaccine III: ·····
 Vaccine IV: ·····

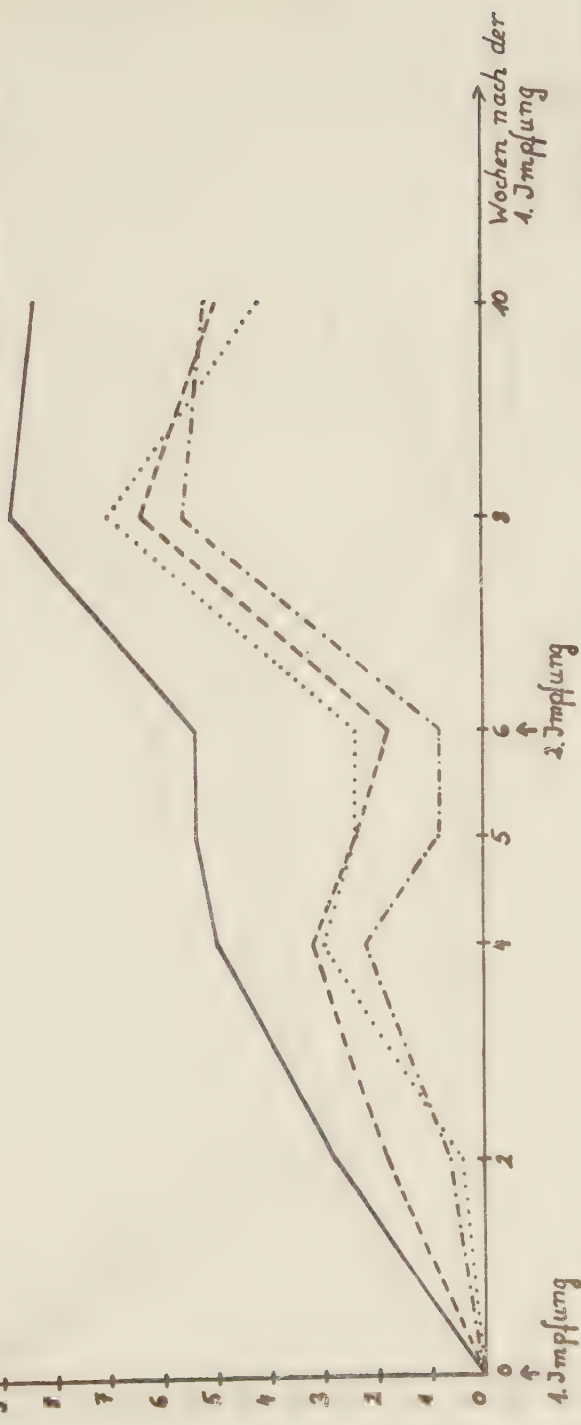


Abb. 3: Verlauf der Antikörperbildung (HAH - Antikörper, Mittelwerte) im Kaninchen gegenüber A-equi 2

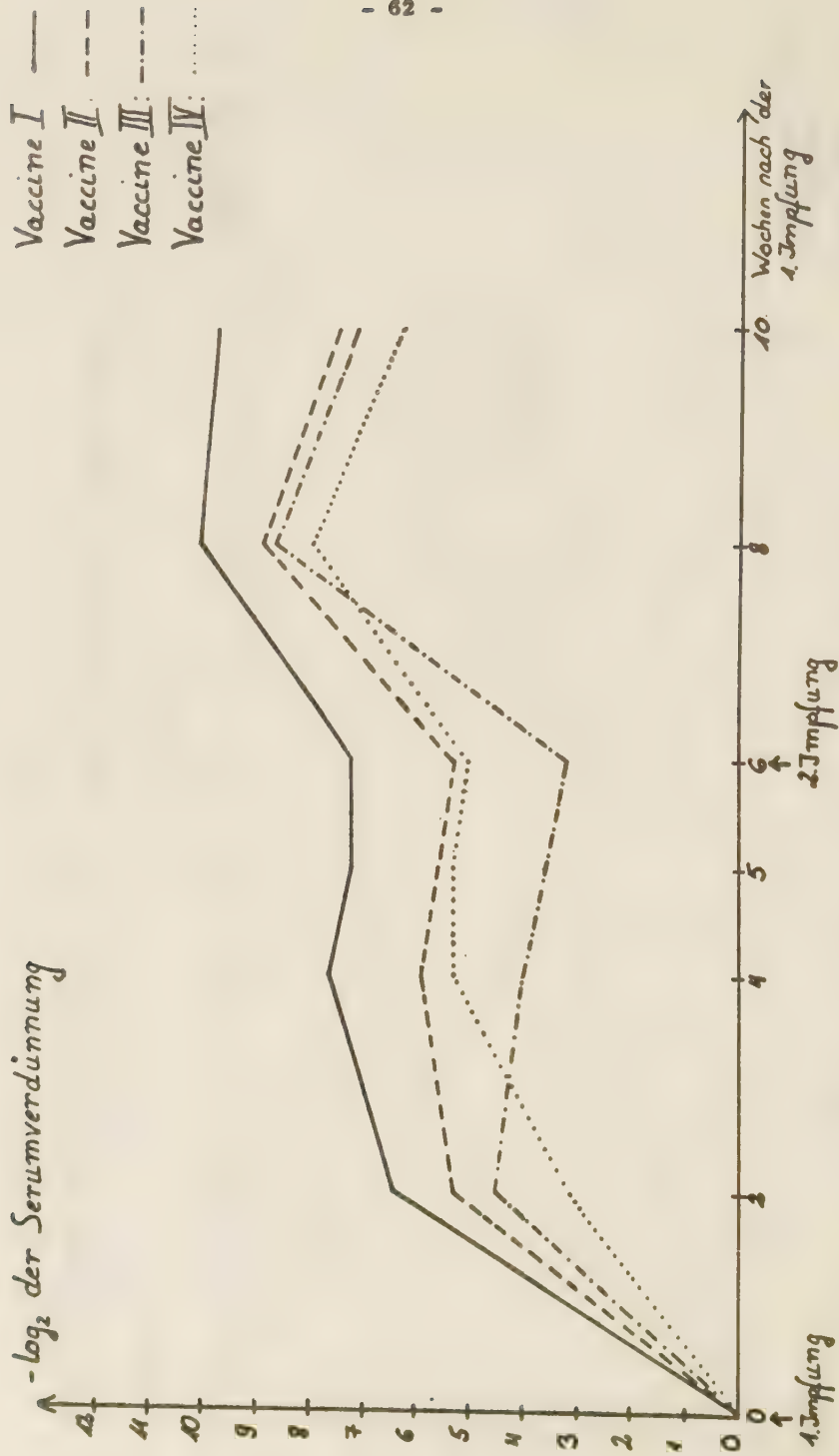


Abb. 4: Verlauf der Antikörperbildung (HAH-Antikörper, Mittelwerte) im Meerschweinchen gegenüber A-equivalent 1

Antikörperbildung

Vaccine I: —
 Vaccine II: - - -
 Vaccine III: ·····
 Vaccine IV: —·—·—

- 63 -



Abb. 5: Verlauf der Antikörperbildung (HAH-Antikörper, Mittelwerte) im Meerschweinchen gegenüber A-equi 2

$-\log_2$ der Serumverdünnung

Vaccine I: —
 Vaccine II: ---
 Vaccine III: - - -
 Vaccine IV: . . .

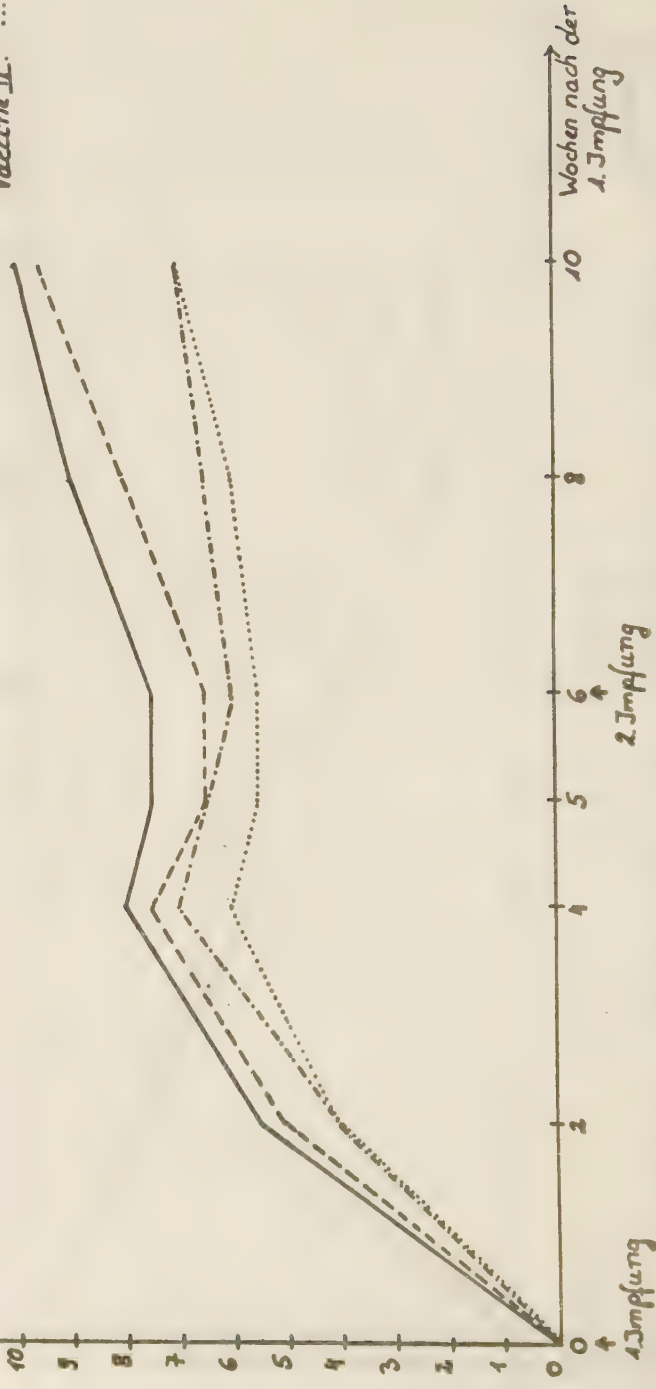


Abb. 6: Verlauf der Antikörperbildung (HAH - Antikörper, Mittelwerte)

$-\log_2$ der Serumverdünnung

Vaccine I: —
 Vaccine II: ---
 Vaccine III: -.-.-
 Vaccine IV:

- 65 -

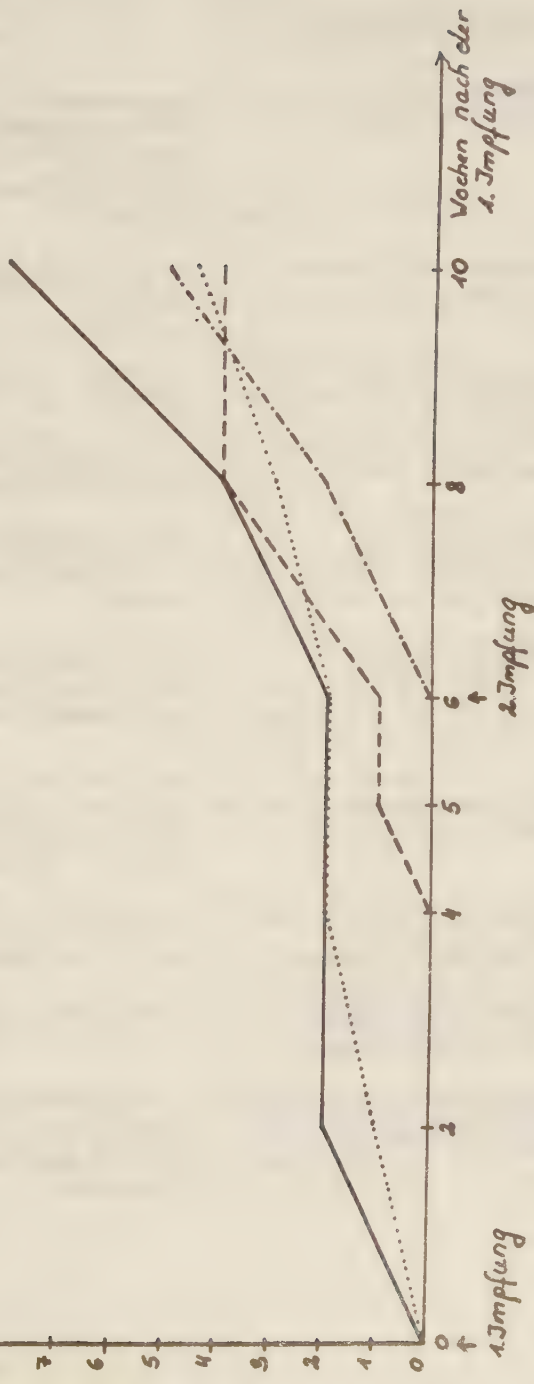


Abb. 7: Verlauf der Antikörperbildung (HAH - Antikörper, Mittelwerte) in der Maus gegenüber A-equi 2

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ackermann, O,
und B. Tiefenbach, 1968: Erfahrungen mit Prevacun bei der Schutzimpfung von Pferden gegen Pferdeinfluenza (Hoppegartener Husten), Blaue Hefte für den Tierarzt, 36, 30-38
2. Beveridge, W.J.B. und
M.A. Rose, 1967: Influenza in horses: Persistence of Antibody measured by three methods.
Brit.vet. J., 123, 8-13
3. Beveridge, W.J.B.;
Mahaffey, L.W. u. M.A. Rose, 1965: Influenza in horses,
Vet.Rec., 77, 57
4. Böhm, H.O., 1965: Die Pferde-Influenza
Deutsch.Tierärztl.Wschr., 72, 512
5. Böhm, H.O. und
D. Panjević, 1968: Zur Immunisierung gegen die
Pferdeinfluenza
Berl.Munch.Tierärztl.Wschr. 19,
392-395
6. Böhm, H.O. und
R.Zeller, 1966: Isolierung eines Influenzavirus
in Deutschland beim seuchenhaften
Husten der Pferde
Berl.Munch.Tierärztl.Wschr. 79,
201
7. Brion, A.; Fontaine, M.P.;
Morailon, R. und Cateigne, 1966: Isolation and Identification of
an Equine influenza virus from
Outbreaks in France,
First Internat.Conf.on Equine
Inf.Dis., Stresa, July (1966)
8. Brion, A; Cateigne, M.;
Fontaine, M.P. und
P. Morailon, 1966: Grippe équine caractérisation de
virus grippaux isolés en 1965
Bull. Acad.Vet., 34, 155
9. Bryans, I.T.; Doll, E.R.;
Wilson, I.C. und
W.H. McCollum, 1966: Immunization for Equine Influenza,
I.Am.vet.med.Ass., 148, 413-417
10. Bryans, I.T.; Zent, W.W.;
Grunert, R.R. und D.C.
Boughton, 1966: I-Adamantanamine hydrochloride
prophylaxis for experimentally
induced A/Equine-2 influenza
virus infection, Nature, 212,
1542-1544

11. Bryans, I.T.; Doll, E.R.;
Wilson, J.C. und
W.W. Zent, 1967: Epizootologic Features of
Disease caused by Myxovirus
influenzae A Equine,
Am. I.vet.Res., 28, 9-17
12. Coleman, M.T.; Dowdle, W.R.;
Pereira, H.G.; Schild, G.C.
u. W.K. Chang, 1968: The HongKong/68 influenza A 2
variant Lancet, 2, 1384-1386
13. Gerber, H., 1966: Influenza des Pferdes
Schweiz.Arch.Tierhk., 108, 167
14. Haltermann, L.G. und
J.L. Mc Queen, 1968: A sereologic study of equine
influenza
I.am.vet.med.Ass., 153, 1069-1073
15. Hoyle, L., 1968: The Influenza Viruses,
"Virology Monograph" Springer-
Verlag, Wien u. New York, 1968
16. Kasel, I.A.; Alford, R.H.;
Knight, V.; Waddell, G.H.
und M.M. Sigel, 1965: Experimental infection of Human
volunteers with equine influenza
virus
Nature Lond., 206, 41-43
17. Kasel, I.A.; Falk, R.V.
und R.B. Couch, 1969: Antigenic Relationship between
the Equine and the HongKong
Human Variant of Influenza Type
A 2 Virus
I.Immunology, 102, 530-532
18. Laver W.G., und
R.C. Valentine, 1969: Morphology of Isolated
Hemagglutinin and Neuraminidase
Subunits of Influenza Virus
Virology, 38, 105-119
19. Maess, I. und
M. Mussgay, 1968: Die antigene Potenz von Pferde-
influenza-Vakzinen
Zbl.vet.med. B, 16, 404 (1969)
20. Mahaffey, W.L., 1964: Pferdeinfluenza
The British Racehorse, 16, 470
21. Masurel, N., 1969: Relation between Hongkong virus
and former human A 2 isolates,
and the A/equi 2 virus in human
sera collected before 1957
Lancet, 1, 907-910
22. Mayr, A.; Pette, I. und
I. Pape, 1966: Untersuchungen über die 1965 bei
Pferden beobachtete Hustenepidemie
(Hoppegartener Husten) in der
Bundesrepublik
Tierärztl.Umschau, 21, 281

23. Mayr, A., 1970: Schutzimpfung gegen Pferde-influenza
Tierärztl.Umschau, 25, 63
24. Minuse, E.; Mc Queen, I.L.; Davenport, F.M. u.
T. Francis, 1965: Studies of antibodies to 1965 and
and 1963 equine influenza
viruses in horses and man
I.Immun. 94, 563-566
25. Muriel, A. Rose, 1966: Sereologic Studies with Equine
Influenza Viruses
Brit.vet.I., 122, 435
26. Paccaud, M.F.; Bürki, F.
u. H. Gerber, 1966: Influenza A/equi 2 in der Schweiz
1965, I. Ätiologie
Zbl.Vet.Med., 13, 417
27. Pape, I.: Zur Geschichte der Forschung über
den seuchenhaften Husten in
Deutschland
Persönliche Mitteilung
28. Pape, I., 1934: Sportwelt 6
29. Parsons, H.F., 1891: Report on the influenza epidemic
of 1889-1890
Local Government Board Report
H.M. Stationery Office, London
324 p.
30. Pette, I. u. P. Teufel,
1966: Züchtung des Pferdeinfluenza-
Virus in Gewebekulturen
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr., 79,
473
31. Pette, I.; Teufel, P.
und R. Zeller, 1967: Erfahrungen bei der Isolierung
und Charakterisierung von Pferde-
influenza-Virus
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr., 80,
325
32. Pressler, K.B., 1969: Untersuchungen mit Pferdeinfluenza-
Adsorbatimpfstoffen
Tierärztl. Umschau 24, 584
33. Pressler, K.B., 1970: Serologische Untersuchungen nach
Pferdeinfluenzaschutzimpfung.
II. Mitteilung: Die Reimmunisie-
rung 1 Jahr nach Erstimpfung
Zbl. für Vet.Med., B 1971: im Druck
34. Mc Queen, I.L.; Steele, H.I.
und R.Q. Robinson, 1968: Influenza in Animals Advances in
Veterinary Science, 12, 285-336
35. Rockborn, G., 1969: Influenza A-variation utan gräns?
Nord.vet.med., 21, 545-549

36. Rolle, M. u. A. Mayr, 1966: Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
37. Rose, M.A., 1966: Equine influenza viruses isolated at Cambridge in 1963 an 1965
Proc. Roy.Soc.med., 59, 51
38. Schechmeister, I.L.; Aeschlimain, T. und W.G. Kammlade, 1967: Use of sodium alginate Adjuvans in Immunization against Equine-Influenza
Am. I. of vet.Res., 28, 1373-1378
39. Schulman, I.L. und E.D. Kilbourne, 1969: The antigenic relationship of the neuraminidase of Hongkong virus to that of other human strains of influenza-A virus
Bull. W.H.O., 41, 425-428
40. Somma, R.E.; Valone, E.R.; Tosi, H.; Giambruno, E.; Infantozzi, I.M. und R. Salsamendi, 1964: Experimental study with the influenza virus A-equi Uruguay
Publ. Trimest. Centro Invest.Vet. "Miguel C. Rubino", 2 No 1, 25
41. Sovinova, O.; Tomova, B.; Pouska, F. u. J.Nemec, 1958: Isolation of virus causing respiratory disease in horses,
Acta virol., 2, 52
42. Stuart-Harris, Charles H., 1970: Pandemic Influenza: An Unresolved Problem in Prevention
I. of Infectious Diseases, 122
43. Waddell, G.H., Teigland, M.B. und M.M. Sigel, 1963: A new influenza virus associated with equine respiratory disease
I.Americ.Vet.Med.Ass., 143, 587
44. Waldmann, O.; Köbe, K. und I. Pape, 1934: Vorläufige Mitteilung über die Ätiologie des Hoppegartener Husten der Pferde
BTW, 50, 1 sowie 50, 561
45. Webster, R.G. and W.G. Laver, 1966: Influenza Virus Subunits Vaccines: Immunogenicity and Lack of Toxicity for Rabbits of Ether- and Detergent-Disrupted Virus
I. Immunol., 96, 596-605

9. LEBENS LAUF

Am 7. Februar 1945 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Dr. Franz Hayler und seiner Frau Agathe Hayler, geb. Pfeiffer, in Aschau/Chiemgau geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und wechselte 1955 auf die Oberrealschule in Prien/Chiemsee über. Nach bestandenem Abitur begann ich im Herbst 1964 an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Veterinärmedizin, wo ich im Sommer 1969 mein tierärztliches Staatsexamen ablegte.

Herrn Prof. Dr. A. M a y r möchte ich
herzlich für die Überlassung des interes-
santen Themas und die hilfreiche Unterstüt-
zung danken.

